

Strukturaufklärung von Komponenten des Curlibioneseapparates aus *Escherichia coli*

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften

der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades

eines Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Johannes Spehr

aus Dresden

1. Referentin:	Professorin Dr. Christiane Ritter
2. Referent:	Professor Dr. Stefan Dübel
eingereicht am:	12.06.2013
mündliche Prüfung (Disputation) am:	12.12.2013

Druckjahr 2014

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

Spehr, J. & Ritter, C.: NMR structural investigation of the chaperone CsgE and its role in Curli fiber assembly. (Poster) 3. Internationales PhD Symposium, Braunschweig (2009).

Spehr, J. & Ritter, C.: NMR structural investigation of the chaperone CsgE and its role in Curli fiber assembly. (Poster) Summer School on Molecular Interactions during Infection, Rügen (2010).

Spehr, J. & Ritter, C.: NMR structural investigation of the chaperone CsgE and its role in Curli fiber assembly. (Poster) 4. Internationales PhD Symposium, Braunschweig (2010).

Spehr, J., Lührs, T. & Ritter, C.: NMR structural investigation of the chaperone CsgE and its role in Curli fiber assembly. (Poster) 5. Internationales PhD Symposium, Braunschweig (2011).

Inhalt

Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis.....	IX
Abkürzungen	1
Zusammenfassung.....	5
Summary	6
1 Einleitung	7
1.1 Proteintransport in gramnegativen Bakterien	7
1.2 Adhäsine gramnegativer Bakterien	10
1.3 Curli - ein enterobakterielles Adhäsın.....	12
1.4 Curli - ein funktionales Amyloid	14
1.5 Curlibildung durch extrazelluläre Nukleation und Präzipitation	16
1.6 Die curlispezifische Exportmaschinerie	19
1.7 Strukturbіologie von Proteinen	23
1.7.1 Röntgenstrukturanalyse von Proteinen	23
1.7.2 NMR-Spektroskopie von Proteinen	25
2 Zielsetzung.....	30
3 Material und Methoden	31
3.1 Materialien.....	31
3.1.1 Chemikalien, Enzyme, Antikörper und kommerzielle Kits.....	31
3.1.2 Molekulargewichtsstandards	32
3.1.3 Bakterienstämme	33
3.1.4 Plasmide.....	34
3.1.5 Oligonukleotide.....	36
3.2 Kulturmedien und Puffer	38
3.3 Molekularbiologische Methoden.....	40
3.3.1 Allgemeine analytische Methoden für DNA	40
3.3.2 Klonierung	40
3.3.3 Zielgerichtete Mutagenese	40
3.4 Produktion von rekombinanten Proteinen und deren Reinigung	41
3.4.1 Überexpression von rekombinanten Proteinen.....	41
3.4.2 Markierung von rekombinanten Proteinen mit stabilen Isotopen.....	42
3.4.3 Reinigung von CsgE-His ₆	42
3.4.4 Reinigung von CsgA-His ₆	42
3.4.5 Reinigung von GST-Fusionsproteinen.....	43
3.4.6 Proteolytische Spaltung von GST-Fusionsproteinen	43
3.4.7 Reinigung und Rückfaltung von CsgF-His ₆	43
3.4.8 Solubilisierung von CsgG-His ₆	44
3.4.9 Gelfiltrationschromatographie.....	44
3.5 Proteinanalytik und Biophysikalische Methoden	45
3.5.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen	45
3.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	45
3.5.3 Western-Blot.....	46
3.5.4 Dynamische Lichtstreuung von Proteinen	46
3.5.5 Thermofluor Assay	47

3.5.6	CD-Spektroskopie	48
3.6	<i>In vivo</i> Komplementation.....	48
3.7	Protein-Protein Interaktionsstudien.....	49
3.7.1	CsgA-Autoaggregation und Thioflavin T Fluoreszenz	49
3.7.2	CsgG-His ₆ Pulldown.....	50
3.7.3	Detektion von CsgE-CsgA Interaktion mit NMR	50
3.7.4	CsgE/CsgA Coaggregation	52
3.8	Kernmagnetresonanzspektroskopie	53
3.8.1	Generelles Vorgehen NMR-Messung	53
3.8.2	Screening von Messbedingungen	53
3.8.3	Probenvorbereitung CsgE Wildtyp pH 3.....	53
3.8.4	Probenvorbereitung CsgE W69S pH 6,5.....	54
3.8.5	Probenvorbereitung ¹⁵ N CsgF	54
3.8.6	Probenvorbereitung ¹³ C/ ¹⁵ N CsgF-His ₆	54
3.8.7	Übersicht zu gemessenen NMR-Datensätzen und Parametern	54
3.8.8	Datenprozessierung und Auswertung	59
3.8.9	Zuordnung von Resonanzen des Proteinerückgrates	59
3.8.10	Zuordnung von Resonanzen der Proteinseitenketten	60
3.8.11	Strukturrechnung.....	60
3.8.12	Strukturverfeinerung.....	61
3.9	Röntgenstrukturanalyse.....	62
3.9.1	Generelles Kristallisationsscreening	62
3.9.2	Proteinkristallisation von CsgE F88S	62
3.9.3	Fischen von Kristallen und Kryokristallographie.....	62
3.9.4	Datenakquisition und Prozessierung.....	62
3.9.5	Molekularer Ersatz	63
3.9.6	Modellbau, Verfeinerung und Validierung	64
4	Ergebnisse.....	65
4.1	Biophysikalische und strukturelle Charakterisierung von CsgE Wildtyp.....	65
4.1.1	Konstrukt- und Strategiewahl	65
4.1.2	Expression und Reinigung von CsgE-His ₆	66
4.1.3	Thermodynamische Stabilität von CsgE-His ₆	67
4.1.4	Versuch der Kristallisation von CsgE-His ₆	68
4.1.5	Charakterisierung der Selbstassoziation von CsgE-His ₆	68
4.1.6	Strategie zur Aufklärung der Lösungsstruktur von CsgE-His ₆	71
4.1.7	Resonanzzuordnung CsgE-His ₆ Wildtyp	72
4.1.8	Lösungsstruktur von CsgE-His ₆ bei pH 3	75
4.2	Charakterisierung des Oligomerisierungszustands von CsgE-Oberflächenmutanten	79
4.3	CsgE F88S zeigt hohe thermodynamische Stabilität <i>in vitro</i>	84
4.4	Kristallstruktur von CsgE F88S	85
4.5	<i>In vitro</i> Interaktionsstudien mit CsgE	93
4.5.1	Charakterisierung der CsgE-CsgA Interaktion durch PRE	93
4.5.2	CsgE verändert die Autoaggregation von CsgA <i>in vitro</i>	98
4.5.3	CsgE coaggregiert mit CsgA <i>in vitro</i>	102
4.6	Die Bindung von CsgE an CsgG.....	104
4.7	Strukturelle Charakterisierung von CsgF-His ₆ in DHPC-Mizellen	107

4.7.1	CsgF liefert hochauflösende NMR-Spektren in Lösung mit Detergenzien	107
4.7.2	Rückgefaltetes CsgF-His ₆ ermöglicht Lösungs-NMR-Strukturaufklärung	110
4.7.3	NMR-Strukturaufklärung von CsgF-His ₆	111
5	Diskussion	117
5.1	Vergleich von CsgE mit Proteinen ähnlicher Topologie	117
5.2	Die Sequenz und Struktur von CsgE ist evolutionär hochkonserviert	120
5.3	Die dynamische Selbstassoziation von CsgE <i>in vitro</i>	122
5.4	Die Komplexität der CsgE/CsgA Interaktion <i>in vitro</i>	124
5.5	Die Mutation F88S in CsgE beeinträchtigt die Curlibildung <i>in vivo</i>	126
5.6	Das Membranprotein CsgF - Mehr als ein Membrananker für Curli?	130
6	Ausblick	134
Anhang	135
	Zusätzliche Abbildungen	135
	Aminosäuresequenzen	142
	Quellenverzeichnis	144
	Danksagung	154

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Sec-abhängiger Proteintransport in gramnegativen Bakterien.....	8
Abbildung 2:	P-Pilus Bildung durch den CU-Weg.	11
Abbildung 3:	Biofilm von <i>E. coli</i>	13
Abbildung 4:	3D-Strukturmodell von HET-s aus <i>Podospira anserina</i>	16
Abbildung 5:	Domänentopologie und Sequenz von CsgA und CsgB.....	18
Abbildung 6:	Kristallstruktur von CsgC aus <i>E. coli</i>	19
Abbildung 7:	Schematische Darstellung der Curlbiogenese.	21
Abbildung 8:	Schematische Darstellung der Röntgenbeugung am Gitter.	24
Abbildung 9:	Aufspaltung der Energieniveaus im Magnetfeld und Präzession der Spinvektoren.	26
Abbildung 10:	Struktur von Thioflavin T.	50
Abbildung 11:	Generelle Strategie zur Strukturaufklärung von Proteinen.	65
Abbildung 12:	Expression und Reinigung von CsgE-His ₆	66
Abbildung 13:	Thermodynamische Stabilität von CsgE-His ₆	67
Abbildung 14:	2D ¹⁵ N-HSQC Spektren von CsgE-His ₆ bei unterschiedlichem pH.....	70
Abbildung 15:	Strategie zur Lösungsstrukturaufklärung von CsgE-His ₆ bei pH 3.....	72
Abbildung 16:	Zuordnung der Resonanzen des Proteinrückgrates CsgE-His ₆ bei pH 3.	73
Abbildung 17:	2D ¹⁵ N-HSQC von CsgE-His ₆ bei pH 3.	74
Abbildung 18:	Lösungsstruktur von CsgE-His ₆ bei pH 3.	77
Abbildung 19:	Analyse der β -Ausstülpung.	78
Abbildung 20:	Cluster aus Aromaten auf der Oberfläche von CsgE-His ₆	79
Abbildung 21:	Positionen von Einzelmutationen auf der Oberfläche von CsgE-His ₆	80
Abbildung 22:	1D NMR-Spektroskopie verschiedener Oberflächenmutanten von CsgE-His ₆	83
Abbildung 23:	Schmelztemperatur von CsgE.	85
Abbildung 24:	Reinigung von CsgE F88S.....	86
Abbildung 25:	Kristalle von CsgE F68S.	87
Abbildung 26:	Kristallstruktur von CsgE F88S bei 2,1 Å.	90

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 27:	Vergleich Kristallstruktur CsgE F88S und NMR-Struktur CsgE-His ₆	91
Abbildung 28:	Wasserstoffbrückennetzwerk in S5 von CsgE F88S.	92
Abbildung 29:	Analyse der PRE-Effekts von CsgA-MTSL auf CsgE Wt bei pH 3.....	94
Abbildung 30:	Analyse des PRE-Effekts von CsgA-MTSL auf ¹⁵ N CsgE W69S bei pH 6,5.	97
Abbildung 31:	Aggregationsverhalten von CsgA in Gegenwart von CsgE Teil 1.	99
Abbildung 32:	Aggregationsverhalten von CsgA in Gegenwart von CsgE Teil 2.	101
Abbildung 33:	Coaggregation von CsgA und CsgE.....	103
Abbildung 34:	Bindung von CsgG-His ₆ an verschiedene Varianten von GST-CsgE.....	105
Abbildung 35:	Reinigung von CsgF als GST-Fusionsprotein.	108
Abbildung 36:	Optimierung der Messbedingungen für CsgF.....	109
Abbildung 37:	Denaturierende Reinigung und Rückfaltung von CsgF-His ₆	110
Abbildung 38:	Vergleich von nativ gereinigtem ¹⁵ N CsgF mit rückgefaltetem ¹⁵ N CsgF-His ₆	111
Abbildung 39:	¹⁵ N-HSQC-Spektrum von ¹³ C/ ¹⁵ N CsgF-His ₆	112
Abbildung 40:	Lösungsstruktur von CsgF-His ₆	115
Abbildung 41:	Oberflächenpotential von CsgF-His ₆	116
Abbildung 42:	Multiples Sequenzalignment für CsgE.....	121
Abbildung 43:	Komplementierung der Curlibildung durch Mutanten von CsgE <i>in vivo</i>	128
Abbildung 44:	Sequenzalignment für CsgF aus verschiedenen Enterobakterien.....	132
Abbildung 45:	NOE-Distanz Dichtematrix CsgE-His ₆	135
Abbildung 46:	RMSD von CsgE-His ₆	136
Abbildung 47:	¹⁵ N-HSQC-Spektren von CsgE Punktmutationen im Vergleich zum Wildtyp.....	137
Abbildung 48:	¹⁵ N-HSQC von CsgE W69S bei pH 6,5.....	138
Abbildung 49:	Durch PRE bei pH 3 relaxierte Protonen auf der Oberfläche von CsgE.	139
Abbildung 50:	Durch PRE bei pH 6,5 relaxierte Protonen auf der Oberfläche von CsgE.	140
Abbildung 51:	NOE-Distanz Dichtematrix CsgF-His ₆	141

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Übersicht über einige funktionale Amyloide.	15
Tabelle 2:	Verwendete Enzyme.	31
Tabelle 3:	Verwendete Antikörper.	31
Tabelle 4:	Verwendete Kits.	32
Tabelle 5:	Verwendete Molekulargewichtsstandards.	32
Tabelle 6:	Bakterienstämme für Klonierung und Überexpression.	33
Tabelle 7:	Verwendete Plasmide für Klonierung und Proteinexpression	34
Tabelle 8:	Subklonierungsprimer für CsgE und CsgF.	36
Tabelle 9:	Primer für QuikChange Mutagenese.	37
Tabelle 10:	Kulturmedien und Zusätze.	38
Tabelle 11:	Puffer und Lösungen.	39
Tabelle 12:	Expressionsbedingungen für rekombinante Proteine.	41
Tabelle 13:	Molare Extinktionskoeffizienten hergestellter Proteine.	45
Tabelle 14:	Übersicht über NMR-Datensätze zur Resonanzzuordnung.	55
Tabelle 15:	Übersicht Akquisitionsparameter und verwendete Pulsprogramme für CsgE Wildtyp pH 3.	56
Tabelle 16:	Übersicht Akquisitionsparameter und verwendete Pulsprogramme für CsgE W69S bei pH 6,5.	57
Tabelle 17:	Übersicht Akquisitionsparameter und verwendete Pulsprogramme für CsgF-His ₆ bei pH 6,5.	58
Tabelle 18:	Spinkorrelationen in gemessenen Tripleresonanzspektren.	59
Tabelle 19:	Spinkorrelationen in gemessenen TOCSY- und NOESY- Spektren.	60
Tabelle 20:	Hydrodynamischer Radius und Polydispersität von CsgE- His ₆ in verschiedenen Puffern.	69
Tabelle 21:	Strukturrechnungs- und Verfeinerungsstatistik für CsgE- His ₆	76
Tabelle 22:	Übersicht über die Eigenschaften der hergestellten CsgE Mutanten.	81
Tabelle 23:	Bestimmung des hydrodynamischen Radius von CsgE Mutanten.	82
Tabelle 24:	Datensammlung und Verfeinerungsstatistik zur Kristallstruktur von CsgE F88S.	89

Tabellenverzeichnis

Tabelle 25:	Strukturerechnungs- und Verfeinerungsstatistik für CsgF-His ₆	114
-------------	--	-----

Abkürzungen

β -A	β -Ausstülpung
γ	gyromagnetisches Verhältnis
Δ	Deletion
ϵ	molarer Extinktionskoeffizient
μ	Mikro
Φ	Proteintorsionswinkel (CO-N-C α -CO)
ψ	Proteintorsionswinkel (N-C α -CO-N)
ω_L	Larmorfrequenz
Å	Ångström
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	Alkaline Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
AU	Absortion unit
B ₀	äußeres Magnetfeld
BCIP	5- Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
BMRB	Biological Magnetic Resonance Bank
C	Celsius
c	Centi
cal	Kalorie
CCD	Charge-coupled device
CCP4	Collaborative Computational Project no. 4
CD	Circulardichroismus
COSY	Correlation spectroscopy
csg	Curli specific gene
CU	Chaperone/Usher
Da	Dalton
DHPC	1,2-Dihexanoyl-sn-glycero-3-phosphocholin
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribunukleosidtriphosphate
DSC	Donor strand complementation
DSE	Donor strand exchange

Abkürzungen

dsRBD	Double stranded RNA binding domain
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ENP	Extrazelluläre Nukleation und Präzipitation
et al.	et alii
FID	Free induction decay
FTIR	Fourier-Transform-Infrarot
g	1. Gramm, 2. Erdbeschleunigung
GFC	Gelfiltrationschromatographie
GST	Glutathion-S-Transferase
h	1. Stunde, 2. Planckkonstante
\hbar	reduzierte Planckkonstante
HFIP	Hexafluoroisopropanol
His₆	Hexahistidintag
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence
Hz	Hertz
HZI	Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung
IMAC	Immobilized metal ion affinity chromatography
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
k	Kilo, Tausend
K	Kelvin
KPi	Kaliumphosphatpuffer
KR	Kongorot
l	Liter
LB	Lysogeny broth
m	Milli
M	1. Mega, 2. Molar
MAD	Multi-wavelength anomalous diffraction
MD	Molekulardynamik
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MG	Molekulargewicht
min	Minute
MIR	Multi isomorphous replacement
MR	Molecular replacement
m_s	Kernspinzustandszahl
MTSL	S-(2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-yl)methyl methanesulfonothioate

Abkürzungen

N22	Aminoterminus vom reifen CsgA-Protein
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
ND	N-terminale Domäne
NMR	Nuclear magnetic resonance
NOE	Nuclear Overhauser effect
NOESY	Nuclear Overhauser enhancement and exchange spectroscopy
OD	Optische Dichte
OG	Octylglucosid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase chain reaction
PD	Polydispersität
PDB	Protein Data Bank
pI	Isoelektrischer Punkt
PP	PreScission-Protease
ppm	Parts per million
PRE	Paramagnetic relaxation enhancement
Psi	Pound-force per square inch
PVDF	Polyvinylidendifluorid
R	Repeat (Sequenzwiederholung)
r	Abstand, Radius
R_D	Hydrodynamischer Radius
R_{frei}, R_{krist}	Kristallographische R-Werte (residual factor)
RMSD	Root-mean-square deviation
rpm	Revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
S	Schleife
s	Sekunde
SAD	Single-wavelength anomalous diffraction
SDS	Sodium dodecyl sulfate
Sec	Sec-Sekretionssystem
Seq.-ID	Sequenzidentität
spp	species pluralis
SRP	Signal recognition particle
SS	Sekretionssystem
SV	Säulenvolumen
T	1. Tesla, 2. Temperatur
TAE	Tris/Acetat/EDTA

Abkürzungen

TB	Terrific broth
TBS-T	Tris buffered saline - Tween
ThT	Thioflavin T
TLR	Toll-like receptor
TLS	Translation/Libration/Screw
TOCSY	Total correlation spectroscopy
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TROSY	Transverse relaxation optimized spectroscopy
U	Unit
ÜN	Über Nacht
UPL	Upper distance limit
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vis	Visuell
V_M	Matthewskoeffizient
Wt	Wildtyp

Zusammenfassung

Als Teil der extrazellulären Matrix werden Curlifimbrien von verschiedenen Enterobakterien, wie *Escherichia coli* oder *Salmonella spp.* gebildet und spielen eine wichtige Rolle in der Biofilmbildung sowie bei der Anheftung an Wirtszellen oder abiotische Oberflächen. Durch extrazelluläre Nukleation und Präzipitation polymerisieren die Curluntereinheiten CsgA und CsgB zu einem funktionalen Amyloid. An diesem Prozess sind zusätzlich das periplasmatische Protein CsgE, das extrazelluläre Protein CsgF und die Membranpore CsgG beteiligt. Für CsgE wurden zuvor eine chaperon-ähnliche Funktion und eine Rolle als Porenverschluss vorgeschlagen. CsgF ist wahrscheinlich in die Curlinukleation involviert und darüber hinaus essenziell für eine membranassoziierte Curlibildung.

In dieser Arbeit wird die Lösungsstruktur von CsgE präsentiert, welche ein $\beta\alpha\beta\beta\alpha$ -Faltungsmotiv und ein oberflächenexponiertes, aromatisches Cluster zeigt, aber keine Homologie zu bekannten Chaperonen oder Porenverschlussdomänen besitzt. Die Mutationen W69S und F88S im aromatischen Cluster von CsgE verringern, ohne Änderung der Gesamtstruktur, die Selbstassoziation des Proteins, wobei die Bindung an CsgA und CsgG *in vitro* erhalten bleibt. Zusätzlich konnte durch Lösungs-NMR eine Bindungsstelle von CsgA entlang einer hydrophoben Oberflächenfurche auf CsgE identifiziert werden. CsgE verlangsamt die CsgA-Autoaggregation *in vitro*, wobei es zur Coaggregation beider Proteine kommt. CsgE F88S kann die Curlibiogenese *in vivo* nicht komplementieren und deutet damit eine Rolle dieses Proteinbereichs in der Porenregulation an.

Außerdem wird die Lösungsstruktur von CsgF in DHPC-Mizellen präsentiert, welche eine Dreidomänenstruktur aufweist. Auf eine N-terminale flexible Domäne mit potentiell CsgG-Transportsignal folgt eine teilhydrophobe α -Helix, die möglicherweise in die Membraninteraktion involviert ist. Ein viersträngiges, antiparalleles β -Faltblatt am C-Terminus stellt eine mögliche Plattform für die Bindung von CsgB dar, essenziell für eine membranassoziierte Curlinukleation.

Die Strukturen von CsgE und CsgF liefern erste molekulare Details über deren Funktion und die strukturelle Grundlage für zukünftige Studien.

Summary

Curli fimbria are produced by different Enterobacteria, like *Escherichia coli* or *Salmonella spp.*, as part of their extracellular matrix. Those fibers play an important role in biofilm formation and for the attachment to host cells or abiotic surfaces. The Curli subunits are assembled into a functional amyloid by an extracellular precipitation and nucleation mechanism. This process involves specific assembly factors, like the periplasmic protein CsgE, the extracellular protein CsgF and the transmembrane pore CsgG. For CsgE previous studies suggested a chaperone-like function and a role as plug for the CsgG pore. CsgF is probably involved in the nucleation process and was shown to be essential for the formation of membrane associated Curli.

In this study the solution structure of CsgE is presented, which shows a $\beta\alpha\beta\beta\alpha$ -fold and contains a surface-exposed aromatic cluster. CsgE has no homology to known chaperones or plug domains. CsgE variants with mutations like W69S or CsgE F88S in the aromatic cluster still interacted with CsgA and CsgG but showed a decreased CsgE self-association, without influencing the overall protein structure. Mapping the CsgA/CsgE interaction site by solution NMR revealed that a hydrophobic groove on CsgE is involved. CsgE/CsgA interaction retarded the CsgA autoaggregation but also induced an unexpected coaggregation. CsgE F88S could not complement the Curli formation in a $\Delta csgE$ mutant *in vivo* and disclosed thereby an important role for the loop around F88 in export regulation.

In addition the solution structure of CsgF in DHPC micelles is presented, which shows three distinct domains. An N-terminal flexible domain containing the potential CsgG-specific export sequence is followed by a semihydrophobic helix which could be involved in membrane interaction. At the C-terminus an antiparallel β -sheet containing four β -strands could be the platform for the interaction with CsgB, which in turn is essential for a membrane associated nucleation of Curli.

The structures of CsgE and CsgF show first molecular details for their function and are the basis of further investigations.

1 Einleitung

1.1 Proteintransport in gramnegativen Bakterien

Gramnegative Bakterien stellen eine Vielzahl unterschiedlicher Proteine her, die verschiedenste Aufgaben für die Zelle erfüllen. Ein großer Teil dieser Proteine wird aus dem Zytoplasma exportiert und anschließend in die innere oder äußere Membran integriert oder erfüllen ihre Funktion im periplasmatischen Raum. Manche Proteine werden von der Zelle in den extrazellulären Bereich sekretiert und dienen zum Beispiel der Bindung von Nährstoffen, wirken als Bakteriozine oder bilden supramolekulare Strukturen, die der Adhäsion dienen. Bekannte Beispiele für bakterielle Adhäsine sind Pilifimbrien und Curlifimbrien, wobei letztere im Fokus dieser Arbeit stehen und deren Transport- und Bildungsmaaschinerie später genauer betrachtet werden.

Für die diversen Bestimmungsorte von Proteinen werden verschiedene Transport- bzw. Exportmaaschinerien benutzt. Eine Integration in die innere Membran erfolgt meist über den Sec-Weg oder den YidC Insertase-Weg. Während der Sec-abhängigen Membranintegration werden die Zielproteine von *signal recognition particles* (SRPs), gebunden und in einem ATP-abhängigen Prozess von der SecA-ATPase und der SecYEG Translokase in die Membran eingebaut (de Gier *et al.* 1996; Xie & Dalbey 2008; Kohler *et al.* 2009). Die YidC-abhängige Membranintegration von Proteinen ist dahingegen noch nicht genau verstanden, da keine hochauflösende Struktur des YidC-Proteins bekannt ist. Wahrscheinlich agiert ein YidC-Homodimer als Kanal, bei dem zwischen zwei Transmembranhelices eine Insertionspore gebildet wird, durch welche die Peptidkette des Zielproteins geschleust wird (Kohler *et al.* 2009).

Der Transport ins Periplasma erfolgt oft ebenfalls über den Sec-Weg (siehe Abbildung 1). Viele Proteine, wie das Maltosebindeprotein binden im Zytoplasma das Chaperon SecB, welches als Tetramer an ungefaltete Substratproteine bindet und eine vorzeitige Faltung verhindert (Zhou & Xu 2005). Die Bindung des Signalpeptids an SecYEG induziert eine Konformationsänderung und somit die Öffnung der Pore (Gelis *et al.* 2007). Nach erfolgtem Transport wird das

Signalpeptid durch eine Signalpeptidase abgespalten und das reife Protein ins Periplasma entlassen (Chatzi *et al.* 2013).

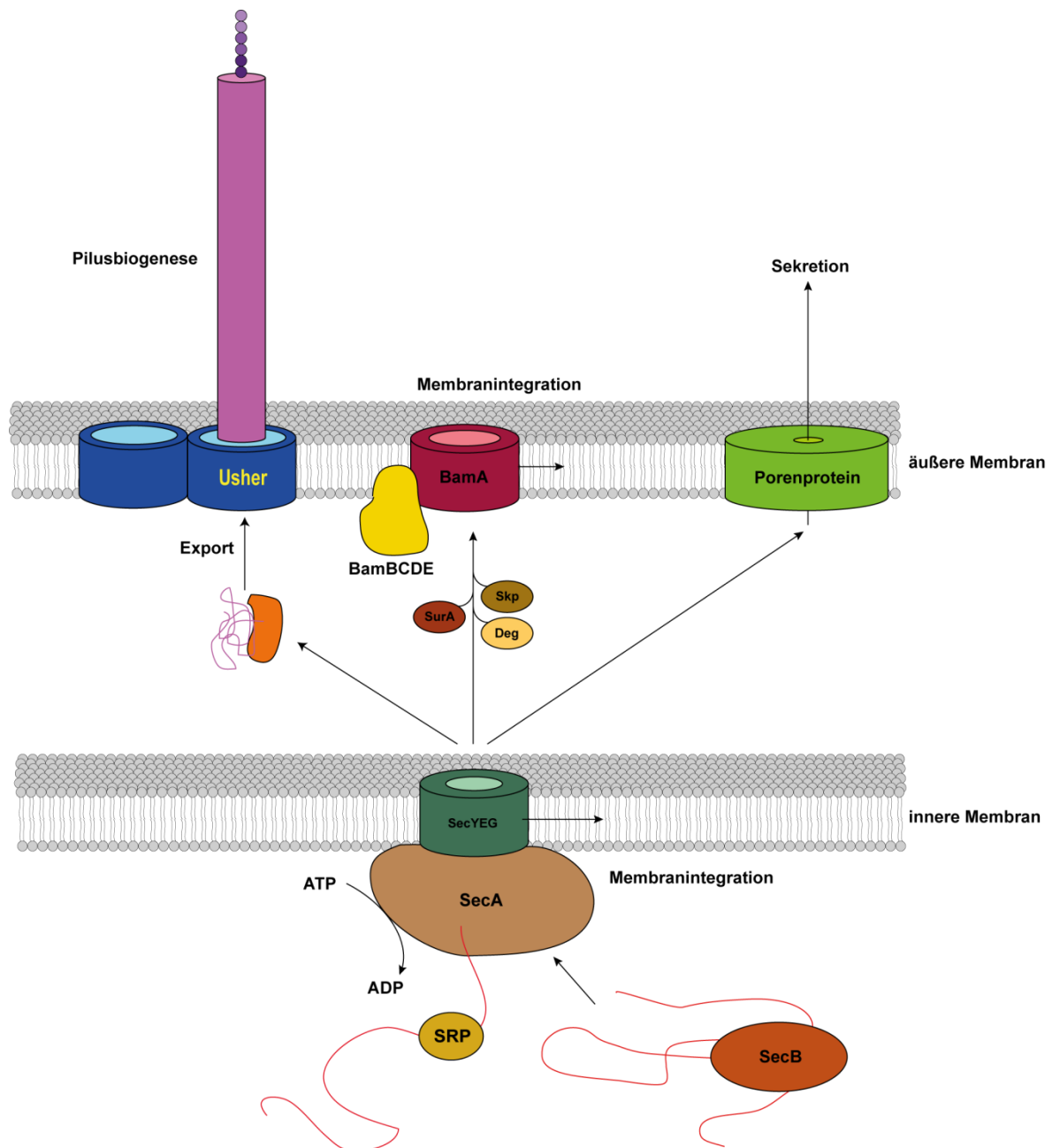


Abbildung 1: Sec-abhängiger Proteintransport in gramnegativen Bakterien. Ungefaltete Proteine werden im Zytoplasma durch SRPs oder SecB stabilisiert. In einem energieabhängigen Prozess werden die Proteine von der SecA-ATPase durch die SecYEG Pore ins Periplasma transportiert bzw. in die innere Membran integriert. Integration von β -Fassproteinen in die äußere Membran erfolgt über den BamA-Weg. Der Export durch die äußere Membran erfolgt durch verschiedene Porenproteine und Transporter oder, wie bei Typ I Pili, über den Chaperon/Usher-Weg.

Zusätzlich zum Sec-Transportweg existiert in gramnegativen Bakterien das Tat-Sekretionssystem, bei dem im Gegensatz zum Sec-Weg auch gefaltete Proteine transportiert werden. Dies ist besonders für Proteine nötig, die schon im Zytoplasma einen Cofaktor binden. Nach Bindung des Exportmotivs an TatBC

kommt es zu Polymerisierung von TatA unter Wirkung der protonenmotorischen Kraft und zur Translokation des Substrats, wobei das Signalpeptid abgespalten wird (Palmer & Berks 2012).

Für die Integration von Proteinen in die äußere Membran sind heute zwei Mechanismen bekannt. Lipoproteine, wie das Membranprotein CsgG der Curlbiosynthese (Loferer *et al.* 1997), verwenden das Lol-System. Zunächst erfolgt die Integration in die innere Membran, aus der sie nach Lipidierung eines N-terminalen Cysteins durch LolCDE freigesetzt werden. Nach Bindung an LolA und Übergabe an LolB erfolgt der Einbau in die äußere Membran.

Ein zweiter Mechanismus, das Bam-System, wird verwendet um β -Fassproteine in die äußere Membran zu integrieren (siehe Abbildung 1). Nach Sec-abhängigen Transport ins Periplasma binden Chaperone wie SurA oder Skp und Deg das Zielprotein und ein Komplex aus BamA und den Lipoproteinen BamB, BamC, BamD und BamE führt dann zum Einbau in die Membran (Dalbey & Kuhn 2012). Ein klassisches Beispiel für eine Bam-abhängige Membraninsertion ist das trimere β -Fass LamB, das für die diffusive Aufnahme von Maltodextrin in die Zelle sorgt (Schirmer *et al.* 1995).

Darüber hinaus haben gramnegative Bakterien einige komplexe Exportsysteme entwickelt um Zielproteine effizient aus der Zelle zu schleusen. Die Sekretionssysteme (SS) des Typs 1, 3, 4 und 6 verwenden einen 1-Schrittmechanismus, bei dem eine große Transportmaschine Zytoplasma und extrazellulären Raum miteinander verbindet. Beide Membranen und das Periplasma werden durch diesen Apparat vollständig überbrückt und Zielproteine können vom Zytoplasma an die Zelloberfläche transportiert werden. Im Falle des Typ-3-Sekretionssystems (T3SS) werden Effektorproteine über eine Nadelstruktur sogar direkt in die Wirtszelle geschleust. T2SS und T5SS verwenden einen 2-Schrittmechanismus, in dem die Zielproteine zunächst über den Sec- oder Tat-Weg ins Periplasma und erst anschließend über Sekretine aus der Zelle exportiert werden. Die Energie für alle Sekretionssysteme bis auf T5SS liefert die Hydrolyse von ATP an der inneren Membran oder die protonenmotorische Kraft (Gerlach & Hensel 2007).

Neben Sekretionssystemen besitzen gramnegative Bakterien eine Reihe spezialisierte Exportproteine und Membranporen, wie den Usher PapC der P-

Pilusbiogenese (Abschnitt 1.2), welche gleichzeitig den Aufbau hochmolekularer Proteinstrukturen koordinieren.

1.2 Adhäsine gramnegativer Bakterien

Gramnegative Bakterien verwenden verschiedene Mechanismen, um sich an abiotische Oberflächen oder Wirtszellen anzuheften, wobei ein Verständnis dieser Prozesse für die Infektionsforschung eine wichtige Rolle spielt. Die dafür verwendeten Adhäsine können in erstens, nicht-fimbrilläre, sekretierte Adhäsine, zweitens, nicht-fimbrilläre Adhäsine, und drittens, Fimbrien unterschieden werden (Soto & Hultgren 1999; Gerlach & Hensel 2007). Zwei interessante Beispiele für sekretierte Adhäsine sind LapA aus *Pseudomonas fluorescens*, welches die Adhäsion an Quarzsand vermittelt (Hinsa *et al.* 2003) und SiiE aus *Salmonella enterica*, welches zur Anheftung an Epithelzellen dient (Gerlach *et al.* 2007). Der Mechanismus über den sekretierte Proteine eine Adhäsion vermitteln ist nicht genau bekannt, aber möglicherweise sind sie zum Teil zellassoziiert.

Ein nicht-fimbrilläres Adhäsins, welches allerdings nicht sekretiert wird, ist der Autotransporter YadA in der äußeren Membran von *Yersinia spp.*, welcher an Proteine der extrazellulären Matrix, wie Fibronectin, Laminin und Kollagen binden kann (Nummelin *et al.* 2004). Die Festkörperstruktur von YadA zeigt eine trimere β -Fassdomäne und eine N-terminale, helikale coiled-coil Domäne, welche für die Adhäsion verantwortlich ist (Shahid *et al.* 2012).

Neben diesen nicht-fimbrillären Adhäsinen bilden gramnegative Bakterien eine ganze Reihe von Fimbrien, wie zum Beispiel Typ I Pili, P-Pili, Typ IV Pili und Curli Pili (letztere ausführlich beschrieben in den Abschnitten 1.3 bis 1.6), um sich an Oberflächen und Wirtszellen anzuheften (Proft & Baker 2009). Die Bildung von Typ I Pili und P-Pili erfolgt über den *Chaperone/Usher* (CU) Weg, der bis heute mechanistisch und strukturell am besten erforscht und verstanden wurde. Abbildung 2 stellt den CU-Weg für P-Pili dar. CU-Pili bestehen aus mehr als tausend Untereinheiten PapA (P-Pili) bzw. FimA (Typ I Pili), die zu einer ca. 2 μ m langen und 7-8 nm dicken helikalen Faser aufgebaut sind (Allen *et al.* 2012). Die Spezifität der Adhäsion wird über unterschiedliche Adhäsionsproteine an der Spitze des Pilus wie PapG bzw. FimH vermittelt (Jones *et al.* 1995; Le Trong *et al.* 2010).

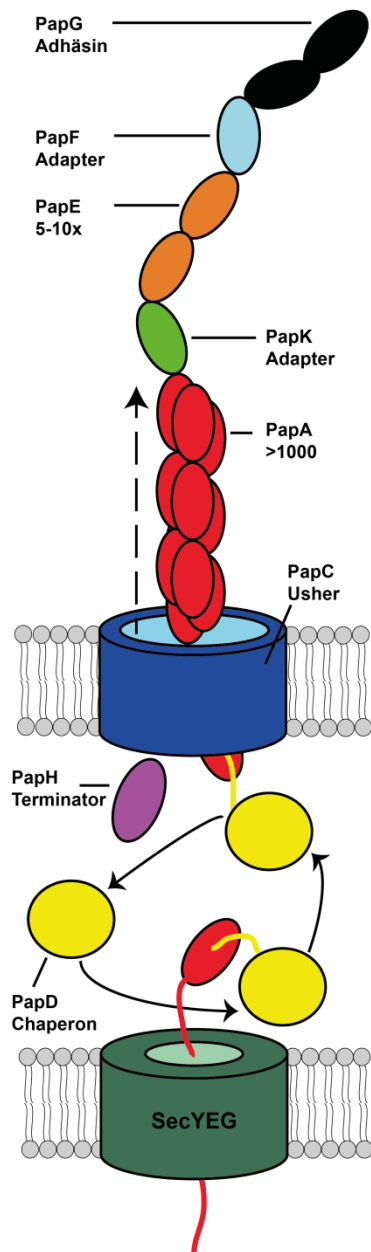


Abbildung 2: P-Pilus Bildung durch den CU-Weg. Nach Sec-abhängigem Export der Pilusuntereinheiten werden diese durch Donorstrangkplementation vom Chaperon PapD gebunden. Die Polymerisierung durch Donorstrangaustausch im PapC-Usher beginnt mit PapG, der Pilusspitze, gefolgt von PapF, PapE, PapK und der Hauptuntereinheit PapA. Das Anhängen des Terminators PapH beendet die Piluspolymerisierung.

Die Biogenese verläuft dabei wie folgt. Nach Sec-vermittelter Sekretion ins Periplasma binden die periplasmatischen Chaperone PapD bzw. FimC an die Pilusuntereinheiten und verhindern dadurch eine intrazelluläre Polymerisierung. Ein Strang des Chaperons bindet in eine hydrophobe Furche auf der Untereinheit und stabilisiert diese, ein Vorgang der als Donorstrangkplementation (DSC) bezeichnet wird (Choudhury *et al.* 1999; Sauer *et al.* 1999). Der Pilus wird durch die Usher-Proteine PapC bzw. FimD zusammengesetzt, welche eine hohe Affinität für Chaperon/Untereinheit-Komplexe zeigen (Nishiyama *et al.* 2003; Nishiyama *et al.* 2005; Nishiyama *et al.* 2008). Inaktive Poren werden durch eine

Porenverschlussdomäne (*plug*) versperrt, um unspezifischen Transport zu verhindern (Remaut *et al.* 2008). Während der Bildung des Pilus wird der Verschluss geöffnet und die Pilusuntereinheiten polymerisieren in einem Prozess der als Donorstrangtausch (DSE) bezeichnet wird (Sauer *et al.* 2002). Wurden zwei Untereinheiten verbunden werden sie durch die Pore befördert und weitere Untereinheiten können an der Pilusbasis angehängt werden. Die Polymerisierung endet im Falle der P-Pili mit dem Terminator PapH, für den allerdings kein Pendant bei Typ I Pili bekannt ist (Verger *et al.* 2006). Die Energie für die Polymerisierung ist im Chaperon/Untereinheit-Komplex gespeichert und wird während des DSE frei (Zavialov *et al.* 2005).

1.3 Curli - ein enterobakterielles Adhäsिन

Bis in die späten 1980er Jahre waren Pilifimbrien und Flagellen die einzigen bekannten Oberflächenorganellen gramnegativer Bakterien. Mit der Entdeckung von Curlifimbrien bei tierpathogenen *Escherichia coli* (Olsen *et al.* 1989) wurde dann eine dritte Klasse von Oberflächenstrukturen beschrieben, die sich deutlich in Bildung und Struktur von allen anderen bekannten Organellen unterscheidet. Bis heute wurde die Curlibildung auch für viele Gattungen aus der Familie der Enterobakterien wie *Salmonella spp.* (Collinson *et al.* 1996), *Citrobacter spp.* oder *Enterobacter spp.* (Zogaj *et al.* 2003) nachgewiesen. Für diese Bakterien erfüllen Curlifimbrien verschiedene Aufgaben in der Biofilmbildung und Pathogenese. Gerade in der frühen Anheftungsphase an Oberflächen oder Gewebe spielen sie eine wichtige Rolle (Vidal *et al.* 1998; Kikuchi *et al.* 2005; Barnhart & Chapman 2006). Später bilden Curli das stabile Gerüst des Biofilms. Curli können außerdem an Wirtsproteine binden, wie zum Beispiel Fibronectin (Olsen *et al.* 1989), Laminin (Olsen *et al.* 1993), Plasminogen und den gewebespezifischen Plasminogenaktivator (Sjöbring *et al.* 1994) oder den Toll-like Rezeptor (TLR) Komplex TLR2/TLR1 (Tükel *et al.* 2009; Tükel *et al.* 2010). In der Darmschleimhaut von Mäusen können Curli über die Aktivierung von TLRs eine proinflammatorische Immunantwort stimulieren (Nishimori *et al.* 2012). Interessanterweise induzieren curlibildende Salmonellen in TLR2-abhängiger Weise eine Verdickung der Darmschleimhaut bei Mäusen, welche das Eindringen von Bakterien erschwert (Oppong *et al.* 2013).

Elektronenmikroskopische Betrachtung von Curli zeigen 6-12 nm dicke, fibrilläre Strukturen unterschiedlicher Länge (Chapman *et al.* 2002), die als unregelmäßiges Gewirr, Bakterienzellen miteinander vernetzen (Abbildung 3).

Die Curlibiogenese ist komplex reguliert und hängt von vielen Umweltbedingungen wie Salzkonzentration, Nährstoff- und Sauerstoffversorgung, vor allem aber von der Temperatur ab (Olsen *et al.* 1989; Arnqvist *et al.* 1992; Römling *et al.* 1998; Gerstel & Römling 2001). Auch wenn die optimale Temperatur für die Curliexpression in *E. coli* unterhalb von 30 °C liegt, konnten Curli in klinischen Isolaten ebenfalls bei 37 °C, der Körpertemperatur des Wirts, nachgewiesen werden (Bian *et al.* 2000).

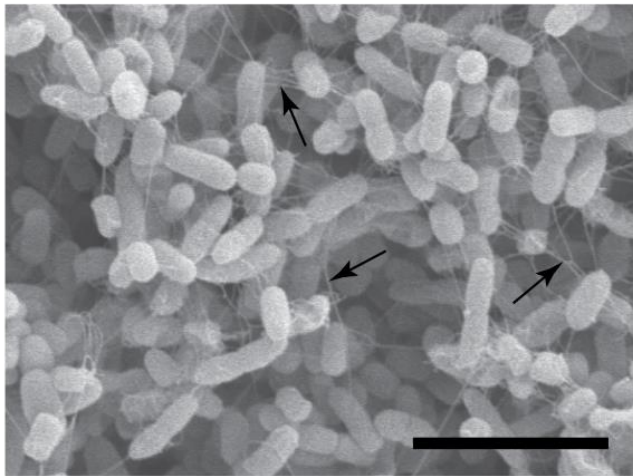


Abbildung 3: Biofilm von *E. coli*.

E. coli Zellen (Patientenisolat aus Harnwegsinfektion) sind über ein Netzwerk aus Curlifibrillen (markiert durch Pfeile) miteinander verbunden und bilden einen Biofilm. Rasterelektronenmikroskopie Maßstab entspricht 5 µm. Quelle: Madhu Nagaraj und Manfred Rohde, HZI Braunschweig.

Für die Bildung von Curlifimbrien ist bei *E. coli* die Transkription von zwei Operons, *csgBAC* und *csgDEFG* nötig (Hammar *et al.* 1995). Der Hauptregulator ist CsgD, ein positiver Transaktivator, der die Expression von CsgA, CsgB und CsgC steuert (Hammar *et al.* 1995; Gerstel *et al.* 2003). Außerdem befindet sich der *csgD* Promotor in einigen weiteren Operons der Biofilmbildung, wie dem der Cellulosebiosynthese (Brombacher *et al.* 2003; Gerstel & Römling 2003). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass CsgD über mindestens zwei unabhängige Wege den Übergang vom planktonischen zum multizellulären Verhalten in *Salmonella typhimurium* reguliert (Römling *et al.* 2000). Die Expression von CsgD selbst ist wiederum komplex reguliert, wie zum Beispiel durch den Osmolaritätssensor OmpR (Prigent-Combaret *et al.* 2001).

1.4 Curli - ein funktionales Amyloid

Der Begriff Amyloid bedeutet „stärkeähnlich“ und wurde erstmals von Rudolf Virchow 1854 benutzt, um Ablagerungen in einer entnommen Leber zu beschreiben (Virchow 1854). Amyloide sind heute vor allem in Beziehung mit Pathologien neurodegenerativer Krankheiten, wie *Morbus Alzheimer*, *Morbus Huntington*, *Morbus Parkinson* oder der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit bekannt. Jede dieser Krankheiten steht im Zusammenhang mit Konformationsänderungen von Proteinen und deren amyloidartiger Ablagerung (Chiti & Dobson 2006). Amyloide besitzen typische Eigenschaften, wie hohe Anteile an β -Faltblattstrukturen, das typische kreuzförmige Beugungsmuster für Röntgenstrahlen, genannt *cross- β* Muster, und die Bindung an Farbstoffe, wie Thioflavin T (ThT) und Kongorot (KR). Die Bindung von ThT führt zu einer Änderung dessen Fluoreszenzeigenschaften, welche sich in einer Rotverschiebung des Absorptions- und Emissionsmaximums ausdrückt. An Amyloide gebundenes KR zeigt eine visuell sichtbare Rotfärbung und führt zusätzlich zur charakteristischen apfelgrünen Doppelbrechung kreuzpolarisierten Lichtes (Eanes & Glenner 1968; Geddes *et al.* 1968; Hirota-Nakaoka *et al.* 2003; Eisenberg & Jucker 2012). Außerdem sind Amyloide durch eine hohe Stabilität gekennzeichnet, auch gegenüber Detergenzien und Proteasen (Bolton *et al.* 1982; Nordstedt *et al.* 1994; Neumann *et al.* 2002; Hirota-Nakaoka *et al.* 2003).

Neben pathogenen Amyloiden ist aber auch eine Vielzahl von funktionalen Amyloiden bei Prokaryoten und Eukaryoten bekannt, welche viele biophysikalische und biochemische Eigenschaften mit pathogenen Amyloiden gemein haben. Eine Übersicht über einige bekannte funktionale Amyloide ist in Tabelle 1 zusammengestellt.

Die Aufgaben, die funktionale Amyloide übernehmen, sind äußerst unterschiedlich und reichen von der Biofilmbildung bei Bakterien über Gedächtnisprozesse bei Seeschnecken bis hin zur Jagd von Spinnen mit Netzen aus Spinnenseide.

Einleitung

Tabelle 1: Übersicht über einige funktionale Amyloide. Als Review siehe (Otzen & Nielsen 2008; Greenwald & Riek 2010).

Amyloid	Organismus	Funktion	Referenz
Chaplins	<i>Streptomyces spp.</i>	Verringerung der Oberflächenspannung von Wasser, Lufthyphenbildung	(Claessen <i>et al.</i> 2003)
Curli	Enterobakterien	Biofilmbildung und Adhäsion	(Chapman <i>et al.</i> 2002)
Microcin E492	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Bacteriocin	(Bieler <i>et al.</i> 2005)
Harpins	versch. pflanzenpathogene Bakterien	Destabilisierung von Zellmembran	(Oh <i>et al.</i> 2007) Oh 2007
Sup35	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Überlesen von Stopcodon auf mRNA ([PSI ⁺] Phänotyp)	(True & Lindquist 2000)
Ure2p	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	involviert in Stickstoffaufnahme	(Baxa <i>et al.</i> 2002)
Rnq1p	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	involviert in <i>de novo</i> Formation anderer Prionen	(Derkatch <i>et al.</i> 2000)
Swi1p	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Chromatinremodellierung	(Du <i>et al.</i> 2008)
Mot3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Transkriptionsregulator, Gene für Zellwandremodellierung	(Alberti <i>et al.</i> 2009)
Hydrophobins	<i>Neurospora crassa</i> (Pilz)	Verringerung der Oberflächenspannung von Wasser, Lufthyphenbildung	(Wösten & de Vocht 2000)
HET-s	<i>Podospora anserina</i> (Pilz)	Heterokaryoninkompatibilität	(Coustou <i>et al.</i> 1997)
CPEB	<i>Aplisia californica</i> (Seeschnecke)	involviert in Gedächtnisprozesse	(Si <i>et al.</i> 2003)
Spidroin	<i>Nephila edulis</i> (Spinne)	Spinnenseide	(Kenney <i>et al.</i> 2002)
Pmel17	<i>Homo sapiens</i>	Melaninsynthese	(Fowler <i>et al.</i> 2005)

Strukturell bis heute am besten charakterisiert ist das HET-s Prion des Fadenpilzes *Podospora anserina*, das in Abbildung 4 dargestellt ist (Ritter *et al.* 2005; Wasmer *et al.* 2008; Van Melckebeke *et al.* 2010). HET-s und die Isoform HET-S sind in einen Prozess involviert, der als Heterokaryoninkompatibilität bezeichnet wird. Dabei kommt es zum Zelltod fusionierter Hyphen die genetisch inkompatibel sind, da sie verschiedenen Kolonien entstammen (Coustou *et al.* 1997). Das HET-s β -Solenoid besitzt senkrecht zur Fibrillenachse angeordnete β -Stränge, welche wiederum β -Faltblätter entlang der Achse bilden, ein typisches Merkmal von Amyloiden.

Curlifimbrien sind ebenso wie andere Amyloide reich an β -Faltblattstrukturen (Chapman *et al.* 2002) und binden die Farbstoffe Kongorot (Hammar *et al.* 1995) und Thioflavin T (Hammer *et al.* 2007). Außerdem besitzen sie eine hohe Stabilität gegenüber Proteasen, Natronlauge, Harnstoff oder SDS (Olsen *et al.* 1989;

Collinson *et al.* 1991). Auch wenn sich Curlifibrillen durch diese Eigenschaften sehr gut in die Klasse funktionaler Amyloide einreihen, sind sie für die Amyloidforschung von besonderer Bedeutung, da Curli für ihre Bildung einen spezialisierten Transportapparat benötigen und bis heute das einzige Amyloid mit einem bekannten Nukleatorprotein darstellen. An diesem Modell können Amyloidpropagation und die Mechanismen der Nukleation sowie des *seedings* genau studiert werden, auch wenn hochauflösende Molekülstrukturen der beteiligten Proteine derzeit noch ausstehen.

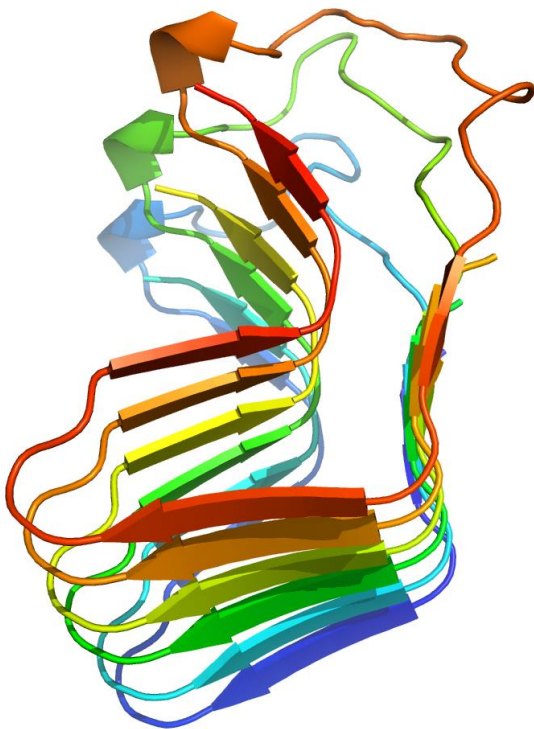


Abbildung 4: 3D-Strukturmodell von HET-s aus *Podospira anserina*. Das Festkörperstrukturmodell des HET-s β -Solenoids aus 3 Monomeren als Teil einer Fibrille (PDBcode: 2RNM). Jedes HET-s Monomer bildet jeweils 2 Windungen der Fibrille. Die β -Stränge verlaufen senkrecht zur Fibrillenachse.

1.5 Curlibildung durch extrazelluläre Nukleation und Präzipitation

Curlifimbrien bestehen aus der Hauptuntereinheit CsgA und dem Nukleatorprotein CsgB (Hammar *et al.* 1995; Hammar *et al.* 1996). Beide Proteine tragen N-terminale Sec-Signalsequenzen, welche nach dem Transport ins Periplasma abgespalten werden (Collinson *et al.* 1991). Reifes CsgA lässt sich, wie in Abbildung 5 dargestellt ist, in eine N-terminale Domäne von 22 Aminosäuren, genannt N22, und eine C-terminale amyloidbildende Domäne einteilen (Wang *et*

al. 2007). Möglicherweise handelt es sich bei N22 um ein CsgG-spezifisches Exportsignal (Robinson *et al.* 2006), das nach dem Transport am Protein verbleibt aber nicht Teil des Amyloidkerns wird (Collinson *et al.* 1999; Wang *et al.* 2007). Die Amyloiddomäne besteht, wie in Abbildung 5 dargestellt ist, aus fünf unvollkommenen Sequenzwiederholungen (kurz R für englisch: *repeat*), mit der Konsensussequenz: S-X5-Q-X-G-X2-G-N-X-A-X3-Q (für *E. coli* CsgA). Auffällig sind der große Anteil an Glutaminen und Asparaginen und die Konservierung von sieben Aminosäurepositionen von R1 bis R5. Strukturvorhersagen zeigen ein Strang-Schleife-Strang-Motiv für R1-R5 (Collinson *et al.* 1999).

Das Nukleatorprotein CsgB besitzt eine ähnliche Domänentopologie wie CsgA. Die N-terminale Domäne (ND) von CsgB weist keine Sequenzhomologie zum glycinreichen N22 von CsgA auf. Der C-Terminus von CsgB besteht ebenfalls aus fünf unvollkommenen Sequenzwiederholungen, wobei R5 gegenüber R1-R4 deutlich weniger konserviert ist (siehe Abbildung 5). Es konnte gezeigt werden, dass R5 von CsgB für die Membranassoziation der Curlifibrillen notwendig ist (Hammer *et al.* 2007). CsgB bildet auf der Zelloberfläche eine Nukleationsplattform für die fibrilläre Präzipitation von CsgA (Loferer *et al.* 1997). Diese spezielle Art der Proteinaggregation wird als extrazelluläre Nukleation und Präzipitation (ENP) bezeichnet. Deutlich wird dieser Mechanismus in der interbakteriellen Komplementierung, bei der ein $\Delta csgB$ Stamm als Donor und ein $\Delta csgA$ Stamm als Akzeptor der Curlibiogenese dienen (Chapman *et al.* 2002). Mischkolonien beider Stämme sind im Gegensatz zu Reinkolonien in der Lage Curli zu bilden. Dies zeigt, dass CsgA löslich von der Zelle sekretiert wird, für dessen fibrilläre Präzipitation *in vivo* aber CsgB nötig ist.

CsgA/CsgB		Sec	N22/ND	R1	R2	R3	R4	R5
CsgA	N22	G V V P Q Y G G G G N H G G G G N N S G P N						
	R1	S E L N I Y Q Y G G G N S A L A L Q T D A R N						
	R2	S D L T I T Q H G G G N G A D V G Q - G S D D						
	R3	S S I D L T Q R G F G N S A T L D Q W N G K N						
	R4	S E M T V K Q F G G G N G A A V D Q - T A S N						
	R5	S S V N V T Q V G F G N N A T A H Q Y						
CsgB	ND	A G Y D L A N S E Y N F A V N E L S K S S F N						
	R1	Q A A I I G Q A G T N S A Q L R Q G G S K						
	R2	L L A V V A Q E G S S N R A K I D Q T G D Y						
	R3	N L A Y I D Q A G S A N D A S I S Q G A Y G						
	R4	N T A M I I Q K G S G N K A N I T Q Y G T Q						
	R5	K T A I V V Q R Q S Q M A I R V T Q R						

Abbildung 5: Domänentopologie und Sequenz von CsgA und CsgB. **Oben:** CsgA und CsgB besitzen ähnliche Domänentopologie: Sec-Signal (Abspaltung während des Transports durch die innere Membran), N-terminaler Domäne und C-terminaler, repetitiver Domäne. **Mitte:** Intramolekulares Sequenzalignment von CsgA. Fünf unvollkommene Wiederholungen R1-R5 mit sieben vollständig konservierten Resten (rot). **Unten:** CsgB mit fünf unvollkommenen Sequenzwiederholungen R1-R5 mit zwei hochkonservierten Glutaminen und einem Alanin. R5 ist gegenüber R1-R4 weniger stark konserviert. Reste in grün sind nur in R1-R4 konserviert. CsgB N-Terminus besitzt keine Sequenzhomologie zum glycinreichen CsgA N-Terminus.

Interessanterweise können CsgA und CsgB auch *in vitro* unabhängig voneinander Amyloidfibrillen bilden (Chapman *et al.* 2002; Hammer *et al.* 2007; Wang *et al.* 2007; Shu *et al.* 2012). Die Nukleation während der Anlaufphase ist dabei der geschwindigkeitsbestimmende Schritt (Jarrett & Lansbury Jr 1993). Anschließend kommt es durch Rekrutierung und Konversion weiterer Monomere und zur Elongation der Fibrille. Die Nukleation ist für CsgB deutlich schneller als für CsgA, wie es für ein Nukleatorprotein zu erwarten ist (Shu *et al.* 2012). Die Studie zeigt außerdem, dass nach Zugabe eines *seeds* (Fibrillen aus CsgA oder CsgB) kein Nukleationsprozess (keine Anlaufphase) für die Polymerisierung nötig ist. Dies steht im Einklang mit dem Modell von Jarrett und Lansbury, in dem die Abläufe der „Nukleation“, der „linearen Polymerisation“ und des „Seedings“ unterschieden werden (Jarrett & Lansbury Jr 1993).

Die Aufteilung von Nukleation und Polymerisation auf zwei Proteine ist für curlbildende Bakterien möglicherweise der Schlüssel, um eine intrazelluläre Präzipitation zu vermeiden. Ob dies allerdings ausreicht, oder ob z. B. Chaperonproteine ebenfalls involviert sind, ist bis heute unbekannt.

1.6 Die curlispezifische Exportmaschinerie

An der Curlibiogenese sind neben den Strukturproteinen CsgA und CsgB auch die Helferproteine CsgC, CsgE, CsgF und CsgG beteiligt. Diese werden ebenfalls Sec-abhängig ins Periplasma transportiert.

CsgC bis heute das einzige Protein aus der Curlifamilie, dessen Kristallstruktur bekannt ist (Salgado *et al.* 2011; Taylor *et al.* 2011). Die Struktur ist in Abbildung 6 dargestellt und zeigt ein immunglobulinähnliches β -Sandwich aus 7 β -Strängen.

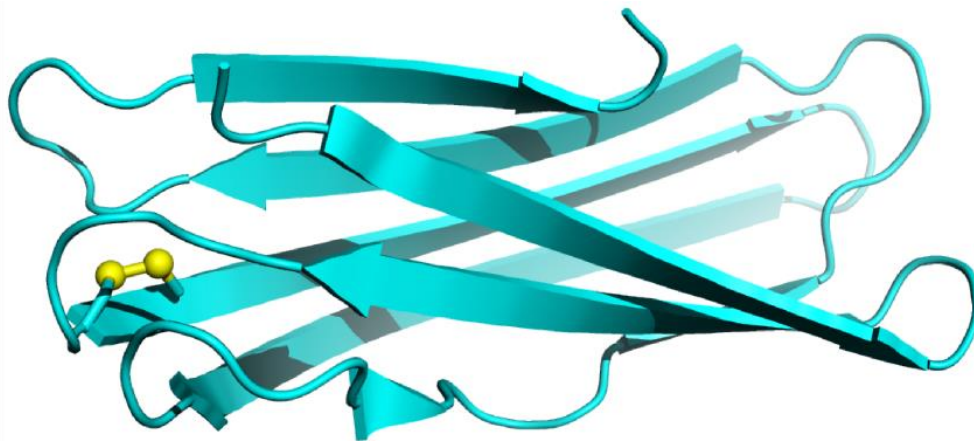


Abbildung 6: Kristallstruktur von CsgC aus *E. coli*. Die Struktur von CsgC (PDBcode: 2Y2Y) zeigt einen immunglobulinähnlichen β -Sandwich bestehend aus 7 β -Strängen. Die oxidierte Form des Proteins ist dargestellt, mit einer Disulfidbrücke im CxC-Motiv (gelb). Das CxC-Motiv ist für die Oxidoreduktaseaktivität des Proteins verantwortlich.

CsgC hat hohe Ähnlichkeiten mit DsbD, einer periplasmatischen Oxidoreduktase, und besitzt wie diese ein CxC Motiv und Oxidoreduktaseaktivität (Taylor *et al.* 2011). Das Redoxpotential von CsgC beträgt -139 mV und ist somit ähnlich zu Proteinen, welche Thiol- oder Disulfidgruppen reduzieren (Taylor *et al.* 2011). Die Autoren der Studie vermuten, dass der Cysteinrest 230 in CsgG ein Substrat für eine CsgC-abhängige Redoxreaktion ist, welche die Disulfidbrücken zwischen einzelnen transmembranen Helices von CsgG-Molekülen knüpfen oder lösen kann und darüber die CsgG-Porenfunktion moduliert.

Für CsgC konnte bis jetzt noch keine explizite Rolle bei der Bildung von Curli gezeigt werden, da Δ csgC Mutanten weiterhin Curli, allerdings mit größerem Durchmesser produzieren. Das Fehlen von CsgC führt außerdem zu einer erhöhten Zelloberflächenhydrophobizität und veränderten Autoagglomeration der Bakterien (Hammar *et al.* 1995; Gibson *et al.* 2007).

Eine Schlüsselfunktion für die Curlibiosegenese besitzt CsgG, ein Lipoprotein der äußeren Membran, das für Sekretion und Stabilität von CsgA und CsgB unerlässlich ist (Loferer *et al.* 1997; Robinson *et al.* 2006). CsgG bildet einen oligomeren Komplex in der äußeren Membran aus wahrscheinlich acht Monomeren (Robinson *et al.* 2006; Taylor *et al.* 2011). Auch wenn bis heute die Molekularstruktur für CsgG nicht bekannt ist, existiert ein Homologiemodell, basierend auf den Strukturen von TolB für die periplasmatische Domäne von CsgG und Wza für die transmembranen Helices (Taylor *et al.* 2011). Mit einem Porendurchmesser von 20 Å wäre ein Transport von kleinen gefalteten oder teilgefalteten Proteinen denkbar. Es konnte gezeigt werden, dass durch Überexpression von CsgG die Zellpermeabilität erhöht wird und die Bakterien sensitiv auf Antibiotika wie Erythromycin reagieren (Robinson *et al.* 2006). Die Selektivität von CsgG wird wahrscheinlich über die Erkennung eines spezifischen Exportsignals erreicht, welches sich in N22 von CsgA befindet. Wie nachgewiesen werden konnte, ist N22 ausreichend, um kleine gefaltete Proteine CsgG-abhängig zu sekretieren (Robinson *et al.* 2006; Nenninger *et al.* 2011). Eine ähnliche Sequenz befindet sich auch am N-Terminus von CsgF, aber nicht an dem von CsgB.

Proteininteraktionen wurden durch Immunpräzipitation zwischen CsgG und CsgE bzw. CsgF gefunden (Robinson *et al.* 2006; Nenninger *et al.* 2011). Die Kollokalisierung von CsgG und Curli an der Zelloberfläche macht die zentrale Rolle der Membranpore für Transport und effiziente Präzipitation deutlich (Epstein *et al.* 2009). Abbildung 7 zeigt schematisch den Prozess der Curlibiosegenese mit allen beteiligten Proteinen.

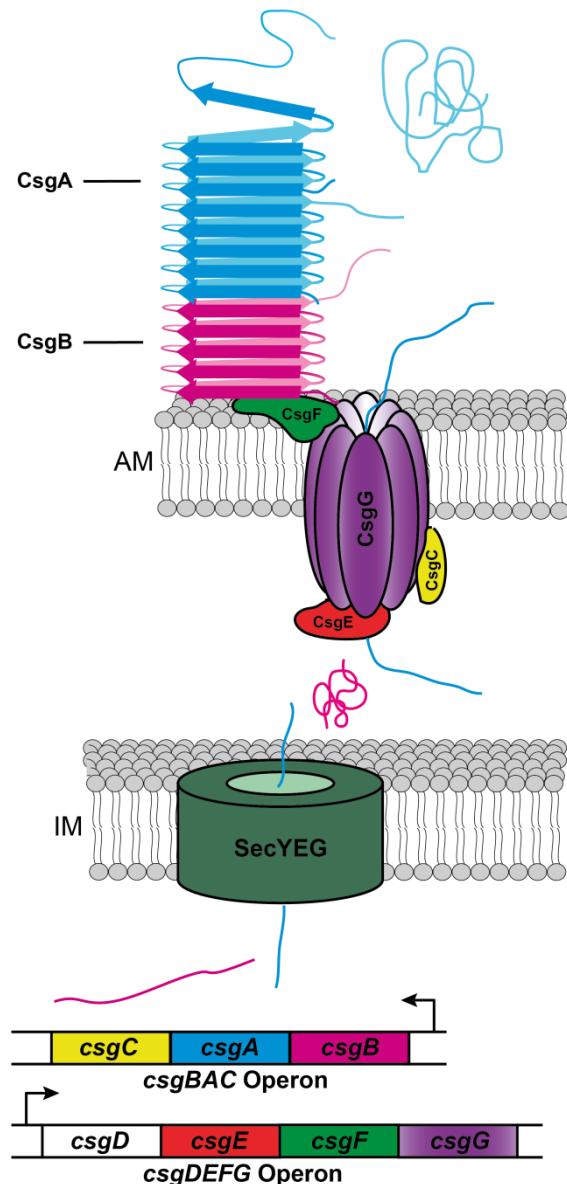


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Curlibiogenese. Die Curliproteine werden durch zwei Operons, *csgBAC* und *csgDEFG* codiert. CsgD steuert als Transaktivator die Transkription des *csgBAC* Operons. CsgA, CsgB, CsgC, CsgE, CsgF und CsgG werden über das Sec-System ins Periplasma transportiert. Das Lipoprotein CsgG bildet eine oligomere Membranpore durch die CsgA, CsgB und CsgF an die Zelloberfläche exportiert werden. CsgE bindet im Periplasma an CsgG und moduliert die Porenfunktion. Der Nukleator CsgB startet die kontrollierte Präzipitation von CsgA auf der Zelloberfläche. Anschließend polymerisiert CsgA an der Fibrillenspitze. CsgF ist für eine zellassoziierte Nukleation nötig und bindet an CsgG oder die äußere Membran. IM innere Membran; AM äußere Membran.

Bei CsgE handelt es sich um ein periplasmatisches Protein der Curlibiogenese, welches in den CsgG-abhängigen Export von CsgA, CsgB und CsgF involviert ist (Chapman *et al.* 2002; Nenninger *et al.* 2009; Nenninger *et al.* 2011). Eine $\Delta csgE$ Mutante kann nicht mehr als Donorstamm aber immer noch als Akzeptorstamm in der interbakteriellen Komplementierung fungieren, was bedeutet, dass die Sekretion von CsgA gestört ist (Chapman *et al.* 2002). Die $\Delta csgE$ Mutante produziert nur wenige Curli, die sich morphologisch deutlich vom Wildtyp unterscheiden. Geringere Mengen von CsgB und CsgF in der $\Delta csgE$ Mutante weisen ebenfalls auf einen Transportdefekt hin (Nenninger *et al.* 2011). Da durch Überexpression von CsgG das Fehlen von CsgE kompensiert werden kann (Nenninger *et al.* 2011), scheint CsgE ein Effektivitätsfaktor des CsgG-abhängigen Exports zu sein. Außerdem zeigt die Studie, dass auch die Spezifität des

Transports, abhängig vom potentiellen Exportsignal N22, über CsgE reguliert wird, da es unspezifischen Transport kleiner Proteine blockiert. Eventuell dient CsgE auch als Verschluss der Pore, da der Import kleiner Substanzen wie des Antibiotikums Erythromycin verhindert wird (Nenninger *et al.* 2011).

Besonders interessant ist, dass CsgE vielleicht auch eine Rolle als Chaperon übernimmt, wie an der Hemmung der CsgA-Autoaggregation *in vitro* gezeigt werden konnte (Nenninger *et al.* 2011). Dies würde auch die Frage beantworten, wie CsgA durch die Zelle transportiert wird, ohne durch Aggregation für die Zelle toxisch zu werden oder durch Proteolyse entfernt wird. Allerdings halten die Autoren der Studie es auch für möglich, dass es sich um ein *in vitro* Artefakt handeln könnte und keine spezifische Interaktion beider Proteine darstellt.

Als weiteres Protein ist CsgF an der Curlibiogenese beteiligt, dessen Funktion ebenfalls nur teilweise verstanden ist. CsgF ist an der Zelloberfläche exponiert und interagiert mit CsgG an der äußeren Membran (Robinson *et al.* 2006). Ob es sich allerdings um einen stabilen Komplex beider Proteine handelt, ist unklar. Mutanten in *csgF* können weiterhin CsgA sekretieren, allerdings findet keine zellassoziierte Curlisynthese statt (Nenninger *et al.* 2009). Da aber diese weiterhin als Donorstamm die interbakterielle Curlibildung komplementieren können, deutet dies beides zusammen auf einen Nukleationsdefekt hin. CsgB und CsgF scheinen sich gegenseitig an der äußeren Membran zu stabilisieren. Auch eine Überexpression von CsgB komplementiert dabei nicht den Zellassoziationsdefekt von Curli in der *csgF* Mutante (Nenninger *et al.* 2009). Das bedeutet, dass CsgF eine komplexe Rolle in der Nukleation von CsgA durch CsgB einnimmt und für die Zellassoziation von Curli unerlässlich ist. Die Expression von C-terminal verkürztem CsgB zeigt einen ähnlichen Phänotyp, wie die $\Delta csgF$ Mutante und deutet damit eine Interaktion beider Proteine über den C-Terminus von CsgB an (Hammer *et al.* 2007). Wahrscheinlich geht die Rolle von CsgF aber über die Membranverankerung von CsgB hinaus, da nur zellassoziiertes CsgB allein nicht ausreicht, um Wildtypcurli zu produzieren (Nenninger *et al.* 2009). Die Autoren schlagen daher eine chaperonähnliche Funktion für CsgF vor, welche für die Bildung eines aktiven CsgB-Nukleus notwendig ist.

1.7 Strukturbiologie von Proteinen

Die Funktion eines Proteins ist immer direkt mit dessen Struktur verknüpft und lässt sich oft daraus ableiten. So können aus Strukturhomologen oft auch Funktionshomologe geschlussfolgert werden. Hierzu liefern hochauflösende strukturbiochemische Methoden Detailinformationen auf atomarer Ebene, die nicht nur die Funktion, sondern auch den Funktionsmechanismus erklären können. Die Strukturelemente von Proteinen lassen sich in Primärstruktur, gegeben durch die Aminosäuresequenz, Sekundärstruktur, wie z. B. α -Helix oder β -Faltblatt, Tertiärstruktur, die räumliche Orientierung von Sekundärstrukturelementen zueinander, und in Quartärstruktur, den Aufbau von Oligomeren, unterscheiden. Diese verschiedenen Strukturmerkmale von Proteinen lassen sich mit unterschiedlichen strukturbiochemischen Methoden untersuchen, die grob in geringauflösende und hochauflösende Verfahren eingeteilt werden können. Mit geringauflösenden Verfahren, wie Circular dichroismus-Spektroskopie (CD) oder Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie (FTIR) lassen sich Informationen über die Verteilung von Sekundärstrukturelementen, Faltung von Proteinen, aber auch über die Proteinstabilität, z. B. durch thermisches Aufschmelzen, sammeln. Von besonderer Bedeutung für die Strukturaufklärung sind heutzutage allerdings die hochauflösenden Methoden Röntgenstrukturanalyse und Kernresonanzspektroskopie (NMR), die in den nachfolgenden Abschnitten einzeln betrachtet werden.

1.7.1 Röntgenstrukturanalyse von Proteinen

Die Röntgenstrukturanalyse beruht auf dem Prinzip der Beugung von Röntgenstrahlen an den Elektronen in einem Proteinkristall. Dieses wird durch die Bragg-Gleichung (Gleichung 1) mathematisch beschrieben und ist in Abbildung 8 veranschaulicht.

Gleichung 1

$$n\lambda = 2d \sin\theta$$

λ	Wellenlänge
n	Beugungsordnung
d	Abstand der Gitterebenen
θ	Glanzwinkel

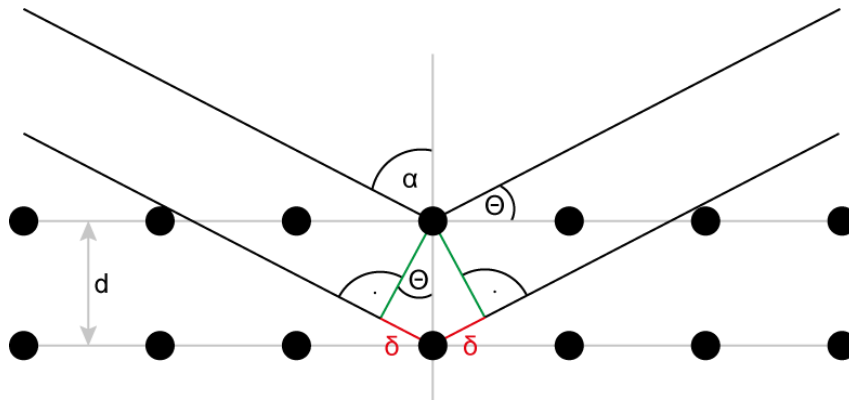


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Röntgenbeugung am Gitter. Konstruktive Interferenz kommt zustande, wenn der Gangunterschied 2δ ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge ist.

Ist die Bragg-Beziehung erfüllt kommt es zur konstruktiven Interferenz, und ein reflektierter Strahl verlässt den Kristall. Dieser Strahl wird als Reflexion auf einem Detektor aufgezeichnet. Mehrere gleichzeitig entstehende Reflexionen bilden ein Diffraktionsbild. Die Gesamtheit der aufgezeichneten Diffraktionsbilder bildet einen Datensatz. Aus den Diffraktionsbildern können die Raumgruppe und die Gitterkonstanten des Kristalls bestimmt werden.

Da nur die Intensität der Strahlung gemessen werden kann, gehen die relevanten Phaseninformationen dabei verloren. Um anschließend aus dem Datensatz eine Elektronendichte berechnen zu können, muss zunächst das Phasenproblem gelöst werden. Dazu werden experimentelle Methoden, wie *single-wavelength anomalous diffraction* (SAD), *multi-wavelength anomalous diffraction* (MAD) oder *multiple isomorphous replacement* (MIR) eingesetzt. Die Methoden beruhen auf dem Vorhandensein von elektronenreichen oder anomal streuenden Schweratomen im Kristall, mit deren Position anschließend die Phasen berechnet werden können. Eine andere Methode, genannt *molecular replacement* (MR), verwendet die Phaseninformationen einer strukturell homologen, bekannten Proteinstruktur, falls eine solche existiert. Dabei wird die bekannte Struktur in der Einheitszelle so platziert, dass die gemessenen Strukturfaktoren interpretiert werden können.

Die berechnete Elektronendichte sollte anschließend durch die Peptidkette des Proteins möglichst vollständig interpretiert werden. Meist werden zusätzlich auch Kristallwasser, Ionen oder kleine Moleküle und Liganden in der Elektronendichte abgebildet. Der Strukturlösungsprozess besteht aus iterativen Modellbau- und Verfeinerungsschritten. Während der Verfeinerung werden auch Daten über

Bindungslängen, Bindungswinkel und Seitenkettenrotamere aus Strukturdatenbanken verwendet. Die Berücksichtigung der kristallographischen R-Faktoren verhindert dabei eine Überinterpretation der experimentellen Daten (R_{frei}) durch das Strukturmodell (R_{krist}).

Mit Röntgenstrukturanalyse können Auflösungen von besser als 1 Å erzielt werden, die sehr genaue Einblicke in die Proteinstruktur aber auch in Protein-Protein-Komplexe oder Protein-Ligand-Komplexe geben. Grundvoraussetzung ist stets das Vorhandensein von Proteinkristallen. Die Proteinkristallisation setzt lösliches Protein in hoher Reinheit (>95 %) im Milligrammmaßstab voraus und erfolgt meist durch langsame Erhöhung der Proteinkonzentration durch Dampfdiffusion in einer oft komplex zusammengesetzten Lösung. Dazu müssen häufig hunderte oder tausende Bedingungen getestet werden, um gut streuende Kristalle (Auflösung besser als 4 Å) zu erhalten. Die Molekülgröße ist dabei nicht limitierend, so konnten schon ganze Ribosomenuntereinheiten kristallisiert werden (Wimberly *et al.* 2000). Nicht in allen Fällen ist die Proteinkristallisation erfolgreich, was oft auf ausgeprägte Flexibilität und Dynamik im Protein oder ausgeprägt polydisperses Verhalten zurückzuführen ist. Besonders intrinsisch unstrukturierte Proteine lassen meist keine Kristallisation zu und können oft nur in Lösung studiert werden.

1.7.2 NMR-Spektroskopie von Proteinen

Bei der NMR-Spektroskopie werden Resonanzfrequenzen von Atomkernen gemessen, deren Kernspin sich von null unterscheidet. Im Falle von Proteinen sind dies ^1H , ^{13}C und ^{15}N , welche alle die Kernspinzahl $\frac{1}{2}$ besitzen. Außerdem ist ein starkes äußeres Magnetfeld B_0 nötig (bei einem 600 MHz Spektrometer beträgt B_0 ca. 14,1 T), um das Kernniveau durch den Zeeman-Effekt in zwei Energieniveaus aufzuspalten (siehe Abbildung 9 A). Die Energiedifferenz zwischen den Niveaus ist dabei proportional zu B_0 und abhängig vom kernspezifischen gyromagnetischen Verhältnis γ (siehe Gleichung 2).

Gleichung 2	$\Delta E = \gamma \cdot \hbar \cdot B_0$	ΔE	Differenz der Energieniveaus
		\hbar	reduzierte Planckkonstante
		γ	gyromagnetisches Verhältnis
		B_0	Magnetfeldstärke

Die Besetzung der Energieniveaus ist boltzmannverteilt und damit zusätzlich zu B_0 auch von der Temperatur abhängig, was bei Raumtemperatur zu einem Besetzungsverhältnis nahe eins führt. Daher ist NMR-Spektroskopie verglichen mit anderen Spektroskopiearten vergleichsweise insensitiv. In einem äußeren Magnetfeld ist der energieärmere Zustand etwas höher besetzt. Dieser Besetzungsunterschied bewirkt eine Nettomagnetisierung entlang B_0 , welche durch elektromagnetische Pulse manipuliert werden kann, wie in Abbildung 9 B dargestellt ist.

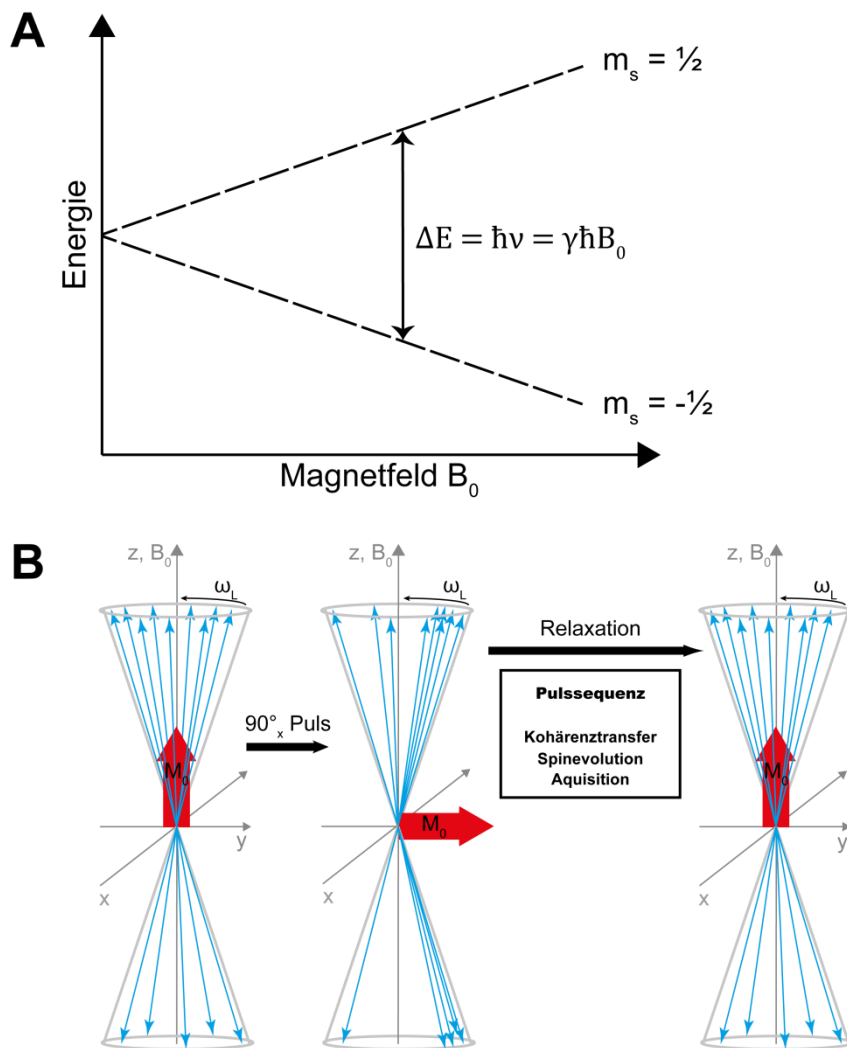


Abbildung 9: Aufspaltung der Energieniveaus im Magnetfeld und Präzession der Spinvektoren. A zeigt die Aufspaltung der Energieniveaus von Kernspins in einem äußeren Magnetfeld abhängig von dessen Feldstärke. B Präzession der Spinvektoren mit der Larmorfrequenz ω_L . Die unterschiedliche Besetzung der Energieniveaus durch das äußere Magnetfeld B_0 führt zu einer Nettomagnetisierung M_0 entlang z. Ein elektromagnetischer Puls (z. B. 90° in x-Richtung) bewirkt Kohärenz der Spinvektoren und Nettomagnetisierung entlang y. Abhängig vom NMR-Experiment wird zum Teil Magnetisierung zwischen Kernen übertragen, Information während Evolutionszeiten gesammelt und zum Schluss ausgelesen. Währenddessen beginnen bereits Relaxationsprozesse die zu Inkohärenz führen und das System ins Gleichgewicht überführen.

Die Spinvektoren präzedieren im Magnetfeld mit der Larmorfrequenz ω_L abhängig von B_0 . Aufgrund der unterschiedlichen chemischen Umgebung einzelner Kerne wirkt B_0 lokal leicht abgeschwächt oder verstärkt und beeinflusst damit auch die Resonanzfrequenzen der Kerne. Um die Resonanzfrequenzen messen zu können muss der Nettomagnetisierungsvektor um 90° gegenüber B_0 mithilfe eines elektromagnetischen Pulses ausgelenkt werden. In einem 1D NMR-Experiment können direkt im Anschluss an die Anregung die Resonanzfrequenzen der Kernspins gemessen werden. Die Frequenzen werden dabei auf eine Referenzfrequenz bezogen und als chemische Verschiebung in *parts per million* (ppm) angegeben.

Nach der Anregung beginnen Relaxationsprozesse, welche die Spins in den Gleichgewichtszustand bringen und damit ein NMR-Experiment einschränken können, auf der anderen Seite aber auch erst ermöglichen. Es wird dabei zwischen der longitudinalen Relaxation und der transversalen Relaxation unterschieden. Die longitudinale Relaxationszeit T_1 beschreibt die Dauer, die das angeregte System braucht, um ins thermische Gleichgewicht zurückzukehren und bestimmt daher in der Praxis die Wartezeit zwischen zwei aufeinanderfolgenden Aufnahmen (*scans*). Währenddessen kommt es aufgrund von Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zu transversaler Relaxation, welche zu Inkohärenz der Spinvektoren führt und als Signalabnahme (*free induction decay* FID) zu beobachten ist.

Um Proteinstrukturen mit NMR aufzuklären wird mehrdimensionale NMR eingesetzt, bei der Magnetisierung zwischen Kernen übertragen wird (Wüthrich 1990). Dieser Transfer kann homonuklear, also zwischen gleichen Kernen, oder heteronuklear, zwischen unterschiedlichen Kernen, erfolgen. Dabei kann die Magnetisierung über Bindungen übertragen werden, in dem die J-Kopplung zwischen Kernen verwendet wird. Dies ist die Grundlage typischer NMR-Experimente für Proteine, wie z. B. 2D *heteronuclear single quantum coherence* (HSQC) (Bodenhausen & Ruben 1980), 2D *correlation spectroscopy* (COSY) (Wüthrich 1986), 2D *total correlation spectroscopy* (TOCSY) (Ernst *et al.* 1989) und 3D Tripleresonanzexperimenten, wie HNCACB (Grzesiek & Bax 1992). Diese Experimente werden verwendet, um die Resonanzfrequenzen den entsprechenden Kernen im Protein zuzuordnen. Neben diesen Informationen über kovalente Kontakte werden für die Berechnung einer Proteinstruktur auch

Distanzen zwischen Atomkernen benötigt. Die dafür verwendeten *nuclear Overhauser enhancement and exchange spectroscopy* (NOESY)-Experimente (Kumar *et al.* 1980) nutzen den *nuclear Overhauser effect* (NOE), der die unterschiedliche Relaxation von gesättigten Kernen aufgrund dipolarer Kopplung beschreibt. Die Intensität des NOE ist proportional zu r^{-6} , wobei r der Abstand zwischen zwei Kernen ist und maximal 5 Å beträgt.

Um heteronukleare mehrdimensionale NMR-Experimente nutzen zu können, müssen Proteine durch rekombinante Expression in Minimalmedium mit den Isotopen ^{13}C und ^{15}N markiert werden, deren natürliches Vorkommen ansonsten nur 1,11 % bzw. 0,37 % beträgt. Wie auch schon bei der Röntgenstrukturanalyse, sollten die Proteine in möglichst hoher Reinheit und hohen Konzentrationen löslich vorliegen, um einen vollständigen NMR-Datensatz, bestehend aus verschiedenen 2D- und 3D-Spektren, aufzunehmen. Die Proteinstabilität spielt dabei eine große Rolle, da die Messzeit typischerweise mehrere Wochen beträgt. Limitierender Faktor der NMR ist hauptsächlich das Molekulargewicht des Proteins oder Proteinkomplexes. Größere Moleküle relaxieren schneller aufgrund längerer Rotationskorrelationszeiten in Lösung, sodass konventionelle NMR meist nur für Proteine bis zu 30 kDa eingesetzt werden kann. Spezielle *transverse relaxation optimized spectroscopy* (TROSY)-Experimente liefern zum Teil auch hochauflösende Daten von noch größeren Molekülen (Pervushin *et al.* 1997).

Die Strukturrechnung aus NMR-Daten unterscheidet sich maßgeblich von der Röntgenstrukturanalyse. Die NMR-Strukturrechnung verwendet sogenannte *restraints* (Randbedingungen), die aus den NMR-Daten generiert werden und unter anderem Informationen über Abstände von Kernen und Bindungswinkel beinhalten. Aktuelle Algorithmen der Strukturrechnung wie Cyana beruhen auf *simulated annealing* (simuliertem Abkühlen), wobei das Molekül eine simulierte Erhitzung auf mehrere tausend Kelvin mit anschließender Abkühlung erfährt (Güntert *et al.* 1997). Lokale Energieminima werden dadurch beseitigt.

Zusätzlich zur Molekularstruktur eines Proteins kann auch dessen Dynamik in Lösung durch NMR studiert werden, indem Relaxationszeiten gemessen werden. Flexibilität und Dynamik von Proteindomänen korrelieren oft mit dem Funktionsmechanismus eines Proteins (Kay 1998) und können durch Röntgenstrukturanalyse nicht erfasst werden. Häufig werden auch Interaktionen von Proteinen mit anderen Molekülen durch NMR untersucht. Dabei kann die

Interaktionsfläche durch *chemical shift perturbations* (Veränderung der chemischen Verschiebung) lokalisiert werden, wenn eine starke spezifische Bindung stattfindet. Da es bei einer Bindung zur Zunahme der Partikelgröße und damit zur Verlängerung der Rotationskorrelationszeit kommt, wird außerdem oft eine Verbreiterung der NMR-Linien beobachtet. Diese Linienverbreiterung kann aber auch durch Interaktionen ausgelöst werden, bei denen ein chemischer Austausch stattfindet. Dieser Austausch (z. B. im Millisekundenbereich) findet dann auf der Zeitskala einer Aufnahme (*scan*) des NMR-Experimentes statt, und bewirkt eine selektive Linienverbreiterung der betroffenen Resonanzen. Eine weitere Methode Interaktionen in Lösung zu studieren, verwendet den Effekt des *paramagnetic relaxation enhancement* (PRE), wobei einer der Bindungspartner mit einer paramagnetischen Sonde markiert wird, und während der Interaktion die Resonanzen involvierter Reste des anderen Bindungspartners spezifisch relaxiert werden. Diese Methode bietet den Vorteil, dass auch schwache, transiente Wechselwirkungen untersucht werden können, da auch ein vorübergehender aber spezifischer Kontakt beider Interaktionspartner eine Relaxation auslösen kann. Eine ausführliche Übersicht über Interaktionsstudien mit NMR wird z. B. von Takeuchi *et al.* und O'Connell *et al.* geliefert (Takeuchi & Wagner 2006; O'Connell *et al.* 2009).

Der grundsätzliche Vorteil von NMR gegenüber Röntgenstrukturanalyse ist die Unabhängigkeit von Proteinkristallen. Dies ermöglicht auch die Untersuchung von hochflexiblen oder intrinsisch unstrukturierten Proteinen. Auch Membranproteine, welche oft sehr schwer zu kristallisieren sind, können gelöst in Detergenzien oder Lipiden durch NMR untersucht werden. Dies zeigt, dass NMR-Spektroskopie von Proteinen in Lösung eine komplementäre Methode zur Röntgenstrukturanalyse darstellt.

2 Zielsetzung

Um komplexe biologische Systeme, wie das der Curlibiogenese, im Detail verstehen zu können, ist es nötig die Molekularstrukturen der beteiligten Proteine aufzuklären. Diese liefern wichtige Einblicke in die Funktion eines Proteins und bilden außerdem die molekulare Grundlage für die Deutung von weiteren *in vitro* und *in vivo* Studien. Der Curliapparat ist eines der am besten untersuchten Systeme zur Biogenese eines funktionalen Amyloids, wobei bis heute die Proteinstrukturen der Helferproteine CsgE und CsgF nicht bekannt sind.

In vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass CsgE die CsgA-Autoaggregation *in vitro* hemmen kann und den Transport von Makromolekülen durch CsgG reguliert.

Es war daher ein Ziel dieser Arbeit die Interaktion zwischen CsgA und CsgE strukturell zu charakterisieren. Dies beinhaltete die Aufklärung der Struktur von CsgE, durch Lösungs-NMR oder Röntgenstrukturanalyse, und anschließende Interaktionsstudien mit Lösungs-NMR und Fluoreszenzspektroskopie *in vitro*. Mit zielgerichteter Punktmutagenese sollten aufgestellte Hypothesen zum Struktur-Funktionszusammenhang überprüft werden. Dies beinhaltete auch *in vivo* Funktionsanalysen, wobei dafür eine Kooperation mit der Gruppe um Matthew Chapman an der Universität Michigan bestand.

Neben CsgE ist auch CsgF an der Curlibiogenese beteiligt, und ist, wie zuvor gezeigt wurde, für eine membranassoziierte Curlinukleation essenziell. Daher war es ein zweites Ziel dieser Arbeit die Struktur von CsgF aufzuklären, um Rückschlüsse auf dessen mögliche Interaktionen mit der Membran oder dem Nukleatorprotein CsgB ziehen zu können.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien, Enzyme, Antikörper und kommerzielle Kits

Die für diese Arbeit verwendeten Standardchemikalien und Materialien stammen von folgenden Firmen: Amersham Biosciences, Fluka, General Electric (GE) Healthcare Merck, Millipore, Omnilab, Qiagen, Roche, Roth, Sigma Aldrich und Stratagene. Generell, falls nicht an entsprechender Stelle vermerkt, wurde immer der Reinheitsgrad *pro analysis* verwendet.

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme, Antikörper und Kits sind in Tabelle 2, Tabelle 3 bzw. Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 2: Verwendete Enzyme.

Enzym	Firma	Spezifikation	Verwendungszweck
Lysozym	Fluka	Glykosidhydrolase	Zellaufschluss
DNAse	Merck	Endodesoxyribonuklease	Zellaufschluss
Platinum Pfx Polymerase	Invitrogen	DNA Polymerase	PCR
Pfu Turbo Polymerase	Stratagene	DNA Polymerase	PCR
T4 DNA Ligase	NEB	DNA Ligase	Ligation
BamHI, DpnI, XhoI	NEB	Restriktionsendonuklease	Restriktionsverdau
PreScission-Protease®	GE Healthcare	Cysteinprotease	Spaltung von Fusionsproteinen

Tabelle 3: Verwendete Antikörper.

Antikörper	Firma	Spezifikation	Verdünnung
anti-His-AP	Invitrogen	anti-Hexahistidin Konjugat alkaline Phosphatase	1:20000

Tabelle 4: Verwendete Kits.

Kit	Firma	Verwendungszweck
Qiaprep Spin Miniprep Kit	Qiagen	Plasmid Reinigung
Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen	PCR Produkt Reinigung
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen	DNA Reinigung aus Agarosegelen
QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene	Punktmutationen in Plasmiden
BCIP/NBT Color Development Substrate	Promega	Entwicklung von Western Blots mit AP-konjugierten AK

3.1.2 Molekulargewichtsstandards

In Verbindung mit Gelelektrophorese von DNA oder Proteinen wurden Standards verwendet (Tabelle 5), um das Molekulargewicht abschätzen zu können.

Tabelle 5: Verwendete Molekulargewichtsstandards.

Name	Firma	Verwendungszweck
PageRuler unstained	Fermentas	SDS-PAGE
Unstained Protein Molecular Weight Marker	Fermentas	SDS-PAGE
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas	SDS-PAGE / Western Blot
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas	SDS-PAGE / Western Blot
Smart Ladder	Eurogentec	Agarosegel / Klonierung
GeneRuler DNA Ladder Mix	Thermo Scientific	Agarosegel / Klonierung

3.1.3 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit für Klonierung bzw. Proteinexpression verwendeten *E. coli* Stämme sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6: Bakterienstämme für Klonierung und Überexpression.

<i>E. coli</i> Stamm	Firma/Ref.	Genotyp	Verwendung
BL21 (DE3)	Stratagene	<i>F– ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])</i>	Überexpression von rekombinanten Proteinen
T7 Express	NEB	<i>fhuA2 lacZ::T7 gene1 [lon] ompT gal sulA11 R(mcr- 73::miniTn10--Tet^S)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10--Tet^S) endA1 Δ(mcrC- mrr)114::IS10</i>	Überexpression von rekombinanten Proteinen
C43	Lucigen	<i>F – ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm (DE3)</i>	Überexpression von rekombinanten Proteinen
DH5α	Invitrogen	<i>F– endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK- mK+), λ–</i>	Klonierung und DNA- Vermehrung
M4100	(Casadaban 1976)	<i>F_ araD139 _ (argF- lac)U169 rspL150(strR) relA1 flbB5301 deoC1 ptsF25 rbsR</i>	<i>In vivo</i> Komplementation
MHR480	(Hammar et al. 1996)	M4100 ΔcsgE	<i>In vivo</i> Komplementation

3.1.4 Plasmide

Für diese Arbeit wurden die in Tabelle 7 aufgeführten Plasmide verwendet. Die Vektoren pET11-d und pGEX6p tragen beide ein Ampicillinresistenzgen.

Tabelle 7: Verwendete Plasmide für Klonierung und Proteinexpression

Plasmid	Eigenschaften	Herkunft
pET11d	Multiple Klonierungsstelle	Novagen
pGEX6p-1	Multiple Klonierungsstelle	GE
pET11-d CsgA ₂₁₋₁₅₁	Wildtyp <i>E. coli</i> CsgA ₂₁₋₁₅₁ -His ₆	A. Eberth HZI Braunschweig
pET11-d CsgA ₂₁₋₁₅₁ N46C	Mutagenese von <i>E. coli</i> CsgA ₂₁₋₁₅₁ -His ₆	A. Zimmer HZI Braunschweig
pET11-d CsgA ₂₁₋₁₅₁ S55C	Mutagenese von <i>E. coli</i> CsgA ₂₁₋₁₅₁ -His ₆	A. Zimmer HZI Braunschweig
pET11-d CsgA ₂₁₋₁₅₁ N136C	Mutagenese von <i>E. coli</i> CsgA ₂₁₋₁₅₁ -His ₆	A. Zimmer HZI Braunschweig
pET11-d CsgE ₂₂₋₁₂₉	Wildtyp <i>E. coli</i> CsgE ₂₂₋₁₂₉ -His ₆	A. Eberth HZI Braunschweig
pET11-d CsgE ₂₂₋₁₂₉ D33A	Mutagenese von pET11-d CsgE ₂₂₋₁₂₉	diese Arbeit
pET11-d CsgE ₂₂₋₁₂₉ D42A	Mutagenese von pET11-d CsgE ₂₂₋₁₂₉	diese Arbeit
pET11-d CsgE ₂₂₋₁₂₉ Y44A	Mutagenese von pET11-d CsgE ₂₂₋₁₂₉	diese Arbeit
pET11-d CsgE ₂₂₋₁₂₉ R45S	Mutagenese von pET11-d CsgE ₂₂₋₁₂₉	diese Arbeit
pET11-d CsgE ₂₂₋₁₂₉ E52A	Mutagenese von pET11-d CsgE ₂₂₋₁₂₉	diese Arbeit
pET11-d CsgE ₂₂₋₁₂₉ R64S	Mutagenese von pET11-d CsgE ₂₂₋₁₂₉	diese Arbeit
pET11-d CsgE ₂₂₋₁₂₉ R68S	Mutagenese von pET11-d CsgE ₂₂₋₁₂₉	diese Arbeit
pET11-d CsgE ₂₂₋₁₂₉ W69S	Mutagenese von pET11-d CsgE ₂₂₋₁₂₉	diese Arbeit
pET11-d CsgE ₂₂₋₁₂₉ W72S	Mutagenese von pET11-d CsgE ₂₂₋₁₂₉	diese Arbeit
pET11-d CsgE ₂₂₋₁₂₉ D80A	Mutagenese von pET11-d CsgE ₂₂₋₁₂₉	diese Arbeit
pET11-d CsgE ₂₂₋₁₂₉ F86S	Mutagenese von pET11-d CsgE ₂₂₋₁₂₉	diese Arbeit
pET11-d CsgE ₂₂₋₁₂₉ F88S	Mutagenese von pET11-d CsgE ₂₂₋₁₂₉	diese Arbeit
pET11-d CsgE ₂₂₋₁₂₉ R92S	Mutagenese von pET11-d CsgE ₂₂₋₁₂₉	diese Arbeit
pET11-d CsgE ₂₂₋₁₂₉ D93A	Mutagenese von pET11-d CsgE ₂₂₋₁₂₉	diese Arbeit

Material und Methoden

Plasmid	Eigenschaften	Herkunft
pET11-d CsgE ₂₂₋₁₂₉ E95A	Mutagenese von pET11-d CsgE ₂₂₋₁₂₉	diese Arbeit
pET11-d CsgE ₂₂₋₁₂₉ F100R	Mutagenese von pET11-d CsgE ₂₂₋₁₂₉	diese Arbeit
pET11-d CsgE ₂₂₋₁₂₉ E106A	Mutagenese von pET11-d CsgE ₂₂₋₁₂₉	diese Arbeit
pET11-d CsgE ₂₂₋₁₂₉ E107A	Mutagenese von pET11-d CsgE ₂₂₋₁₂₉	diese Arbeit
pGEX6p-CsgE ₂₂₋₁₂₉	GST-CsgE Wildtyp Fusionsprotein	diese Arbeit
pGEX6p-CsgE ₂₂₋₁₂₉ D33A	Mutagenese von GST-CsgE ₂₂₋₁₂₉ Wildtyp Fusionsprotein	diese Arbeit
pGEX6p-CsgE ₂₂₋₁₂₉ D42A	Mutagenese von GST-CsgE ₂₂₋₁₂₉ Wildtyp Fusionsprotein	diese Arbeit
pGEX6p-CsgE ₂₂₋₁₂₉ Y44S	Mutagenese von GST-CsgE ₂₂₋₁₂₉ Wildtyp Fusionsprotein	diese Arbeit
pGEX6p-CsgE ₂₂₋₁₂₉ R45S	Mutagenese von GST-CsgE ₂₂₋₁₂₉ Wildtyp Fusionsprotein	diese Arbeit
pGEX6p-CsgE ₂₂₋₁₂₉ E52A	Mutagenese von GST-CsgE ₂₂₋₁₂₉ Wildtyp Fusionsprotein	diese Arbeit
pGEX6p-CsgE ₂₂₋₁₂₉ R64S	Mutagenese von GST-CsgE ₂₂₋₁₂₉ Wildtyp Fusionsprotein	diese Arbeit
pGEX6p-CsgE ₂₂₋₁₂₉ R68S	Mutagenese von GST-CsgE ₂₂₋₁₂₉ Wildtyp Fusionsprotein	diese Arbeit
pGEX6p-CsgE ₂₂₋₁₂₉ W69S	Mutagenese von GST-CsgE ₂₂₋₁₂₉ Wildtyp Fusionsprotein	diese Arbeit
pGEX6p-CsgE ₂₂₋₁₂₉ W72S	Mutagenese von GST-CsgE ₂₂₋₁₂₉ Wildtyp Fusionsprotein	diese Arbeit
pGEX6p-CsgE ₂₂₋₁₂₉ D80A	Mutagenese von GST-CsgE ₂₂₋₁₂₉ Wildtyp Fusionsprotein	diese Arbeit
pGEX6p-CsgE ₂₂₋₁₂₉ F86S	Mutagenese von GST-CsgE ₂₂₋₁₂₉ Wildtyp Fusionsprotein	diese Arbeit
pGEX6p-CsgE ₂₂₋₁₂₉ F88S	Mutagenese von GST-CsgE ₂₂₋₁₂₉ Wildtyp Fusionsprotein	diese Arbeit
pGEX6p-CsgE ₂₂₋₁₂₉ R92S	Mutagenese von GST-CsgE ₂₂₋₁₂₉ Wildtyp Fusionsprotein	diese Arbeit
pGEX6p-CsgE ₂₂₋₁₂₉ D93A	Mutagenese von GST-CsgE ₂₂₋₁₂₉ Wildtyp Fusionsprotein	diese Arbeit
pGEX6p-CsgE ₂₂₋₁₂₉ E95A	Mutagenese von GST-CsgE ₂₂₋₁₂₉ Wildtyp Fusionsprotein	diese Arbeit
pGEX6p-CsgE ₂₂₋₁₂₉ F100S	Mutagenese von GST-CsgE ₂₂₋₁₂₉ Wildtyp Fusionsprotein	diese Arbeit
pGEX6p-CsgE ₂₂₋₁₂₉ E106A	Mutagenese von GST-CsgE ₂₂₋₁₂₉ Wildtyp Fusionsprotein	diese Arbeit
pGEX6p-CsgE ₂₂₋₁₂₉ E107A	Mutagenese von GST-CsgE ₂₂₋₁₂₉ Wildtyp Fusionsprotein	diese Arbeit
pET11-d CsgF ₁₉₋₁₃₈	Wildtyp <i>E. coli</i> CsgF ₁₉₋₁₃₈ -His ₆	A. Eberth HZI Braunschweig

Plasmid	Eigenschaften	Herkunft
pGEX6p-CsgF ₁₉₋₁₃₈	GST-CsgE Wildtyp Fusionsprotein	diese Arbeit
pET11-d CsgG ₁₋₂₇₇	Wildtyp <i>E. coli</i> CsgG ₁₋₂₇₇ -His ₆ , native Expression in die äußere Membran	T. Schubeis HZI Braunschweig
pLR2	<i>csgBAC</i> Promotor	(Robinson <i>et al.</i> 2006)

3.1.5 Oligonukleotide

Für die Subklonierung von CsgE und CsgF in den pGEX6p-Vektor wurden die in Tabelle 8 genannten Oligonukleotide verwendet.

Tabelle 8: Subklonierungsprimer für CsgE und CsgF.

Primernamen	Sequenz (5' – 3')	Restriktionsstelle
<i>gst-csgE</i> vorwärts	TATAGGATCCGCCGTTGAGGTAG AAGTCCC	BamHI
<i>gst-csgE</i> rückwärts	TATACTCGAGTTAGAATTCATCAT GCGCCAAATCG	XhoI
<i>gst-csgF</i> vorwärts	TATAGGATCCGCTGGAACCATGA CTTTC	BamHI
<i>gst-csgF</i> rückwärts	TATACTCGAGTTAAAAATCGGTTG AGTTATTTTGTAAC	XhoI

Für die an *csgE* in den Vektoren pET11-d und pGEX6p durchgeführte QuikChange Mutagenese wurden die folgenden Oligonukleotide verwendet (siehe Tabelle 9). Nur der Vorwärtsprimer ist aufgeführt, der Rückwärtsprimer war revers komplementär dazu.

Tabelle 9: Primer für QuikChange Mutagenese.

Primernamen	Sequenz (5' - 3')	Mutation
<i>csgE</i> D33A	TCCCGGGATTGCTAACTGCGCATACTGTTTCATCT ATTGGCCAT	D33A
<i>csgE</i> D42A	ACCATACTGTTTCATCTATTGGCCATGCGTTTTACC GAGCCTTTAGTG	D42A
<i>csgE</i> Y44S	CATCTATTGGCCATGATTTTAGCCGAGCCTTAGTG ATAAATGGG	Y44S
<i>csgE</i> R45S	GTTTCATCTATTGGCCATGATTTTTACAGCGCCTTT AGTGATAAATGGGAAAGTGAC	R45S
<i>csgE</i> E52A	CCGAGCCTTTAGTGATAAATGGGCGAGTGACTATA CGGGTAAC	E52A
<i>csgE</i> R64S	CTTAACGATTAATGAAAGCCCCAGTGCACGATGGG G	R64S
<i>csgE</i> R68S	GATTAATGAAAGGCCAGTGCAAGCTGGGGAAGC TGGATCACTATAAC	R68S
<i>csgE</i> W69S	GGCCCAGTGACGAAGCGGAAGCTGGATCACTAT AACG	W69S
<i>csgE</i> W72S	CCAGTGACGATGGGGAAGCAGCATCACTATAAC GGTCAATC	W72S
<i>csgE</i> D80A	GAAGCTGGATCACTATAACGGTCAATCAGGCGGTT ATTTCCAGACTTT	D80A
<i>csgE</i> F86S	CAGGACGTTATTTCCAGACTAGCTTATTTCCGTTG AAAAGAGACTTCG	F86S
<i>csgE</i> F88S	GGACGTTATTTCCAGACTTTTTTAAGCCCGTTGAA AAGAGACTTCGAG	F88S
<i>csgE</i> R92S	CTTTTTTATTTCCGTTGAAAAGCGACTTCGAGAAAA CTGTCGTC	R92S
<i>csgE</i> D93A	GACTTTTTTATTTCCGTTGAAAAGAGCGTTTCGAGAA AACTGTCGTCTTTGC	D93A
<i>csgE</i> E95A	CCGTTGAAAAGAGACTTCGCGAAAAGTGTCTCTT TGCACTGATT	E95A
<i>csgE</i> F100S	GACTTCGAGAAAAGTGTCTCAGCGCACTGATTCA AACTGAAGAAG	F100S
<i>csgE</i> E106A	CTTTGCACTGATTCAAAGTGGGAAGCACTAAATC GTCGCC	E106A
<i>csgE</i> E107A	GTCTTTGCACTGATTCAAAGTGGGAAGCACTAAA TCGTCGCC	E107A

3.2 Kulturmedien und Puffer

Die für die Bakterienkultivierung und Proteinüberexpression eingesetzten Kulturmedien und Medienzusätze sind in Tabelle 10 aufgeführt. Zur Isotopenmarkierung von Proteinen in CN040 Minimalmedium wurden ^{15}N NH_4Cl 99 % (Cambridge Isotope Laboratories) und $\text{U-}^{13}\text{C}_6$ D-Glucose 99 % (Cambridge Isotope Laboratories) verwendet. Zur Plasmidselektion wurden 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin (Amp) im jeweiligen Medium verwendet.

Tabelle 10: Kulturmedien und Zusätze.

Kulturmedium	Zusammensetzung
Lysogeny Broth (LB-Medium)	1 % (w/v) Bacto-Trypton; 0,7 % (w/v) NaCl; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; pH-Wert 7,5 mit Natronlauge eingestellt
LB-Agar	LB-Medium; 1,5 % (w/v) Agar-Agar
Terrific Broth (TB-Medium)	1,2 % (w/v) Bacto-Typton; 2,4 % (w/v) Hefeextrakt; 0,4 % (v/v) Glycerin; 1fach TB-Salzlösung
10fach TB-Salzlösung	0,17 M KH_2PO_4 ; 0,72 M K_2HPO_4
CN040 (Minimalmedium)	50 mM Na_2HPO_4 ; 50 mM KH_2PO_4 ; 1 g/L NH_4Cl ; 4 g/L Glucose; 5 mM Na_2SO_4 ; 2 mM MgSO_4 ; 1 % 100x MEM Vitaminmix (Sigma-Aldrich); 0,02 % 5000x Spurenmetalllösung
Spurenmetalllösung (5000x)	50 mM FeCl_3 ; 20 mM CaCl_2 ; 10 mM MnCl_2 ; 10 mM ZnSO_4 ; 2 mM CoCl_2 ; 2 mM CuCl_2 ; 2 mM NiCl_2 ; 2 mM Na_2MoO_4 ; 2 mM Na_2SeO_3 ; 2 mM H_3BO_3 ; 60 mM HCl
KR-YESCA-Agar	10 g/L Casaminoäuren; 1 g/L Hefeextrakt; 20 g/L Agar-Agar; 50 $\mu\text{g/ml}$ Kongorot

In Tabelle 11 findet sich eine Liste der verwendeten Puffer. Veränderungen sind ansonsten an entsprechender Stelle im Text vermerkt.

Material und Methoden

Tabelle 11: Puffer und Lösungen.

Puffer bzw. Lösung	Zusammensetzung
Denaturierungspuffer	100 mM Kaliumphosphat pH 7,2; 150 mM NaCl; 8 M GuanidiumHCl
IMAC-Zelllysepuffer	50 mM Kaliumphosphat pH 7,2; 150 mM NaCl
GST-Zelllysepuffer	50 mM Tris pH 8; 150 mM NaCl
IMAC-Elutionspuffer	50 mM Kaliumphosphat pH 7,2; 150 mM NaCl; 500 mM Imidazol; 10 % Glycerin
denaturierender IMAC- Elutionspuffer	50 mM Kaliumphosphat pH 7,2; 150 mM NaCl; 300 mM Imidazol; 8 M Guanidinium-HCl
GST-Elutionspuffer	50 mM Tris pH 8; 150 mM NaCl; 50 mM reduziertes Glutathion (immer frisch hergestellt)
PreScission-Protease- puffer	50 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM DTT
1fach TAE-Puffer	40 mM Tris pH 8,2; 20 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA; pH mit Essigsäure eingestellt
1fach TBS-T-Puffer	20 mM Tris pH 8; 150 mM NaCl; 0,05 % (v/v) Tween-20
Alkaline Phosphatase Puffer (AP-Puffer)	0,1 M Tris-Base pH 9,5; 0,1 M NaCl; 5 mM MgCl ₂
20x SDS-PAGE Laufpuffer	1 M MES; 1M Tris-Base; 70 mM SDS; 20 mM EDTA
Transferpuffer für Westernblot	20 mM Tris; 192 mM Glycin; 15 % (v/v) Methanol
6x DNA-Ladepuffer	10 mM Tris-HCl pH 7,4; 25 mM EDTA; 30 % (v/v) Glycerin
4x SDS-Probenpuffer	0,25 M Tris-HCl pH 6,8; 8 % (w/v) SDS; 0,002 % (w/v) Bromphenolblau; 40 % (v/v) Glycerin; 20 % β -Mercaptoethanol

3.3 Molekularbiologische Methoden

Generelle molekularbiologische Methoden und Vorgehensweisen wurden aus den Arbeiten von Ausubel *et al.* und Coligan *et al.* übernommen (Coligan *et al.* 2003; Ausubel *et al.* 2007). Außerdem wurden die Herstellerangaben der verwendeten Enzyme und Kits befolgt. Alle Änderungen zu diesen Standardprotokollen sind an entsprechender Stelle vermerkt.

3.3.1 Allgemeine analytische Methoden für DNA

Zur Analyse von restriktionsverdauten Plasmiden oder PCR-Produkten wurde Agarose Gelelektrophorese eingesetzt. Dafür wurden 0,8 %ige Agarosegele in TAE-Puffer hergestellt und mit 5 % (v/v) Ethidiumbromid versetzt. Mit DNA-Ladepuffer versetzte Proben wurden bei 5 V/cm für 30-60 min, je nach notwendiger Trennung, gelelektrophoretisch separiert. Anschließend wurden die Agarosegele durch UV Illumination bei einer Wellenlänge von 254 nm analysiert und dokumentiert.

Die Konzentrationsbestimmung von DNA wurde photometrisch mithilfe eines NanoDrop (peqlab Biotechnologie GmbH) bei 260 nm durchgeführt.

3.3.2 Klonierung

Eine Auflistung über die in dieser Arbeit zur Klonierung verwendeten Enzyme, Plasmide, Primer und Kits findet sich in dem Abschnitt 3.1. Ein typischer PCR-Ansatz enthielt: 80 ng DNA-Template, 0,5 µM jeden Primers, 0,3 mM dNTP-Mix, 1 mM MgSO₄, 1 fach Polymerase-Puffer, 1,25 U Platinum *Pfx*-Polymerase, aufgefüllt mit Wasser auf 50 µl. Nach anschließender Reinigung (PCR-Product-Purification Kit) wurden das PCR-Produkt und das Zielplasmid mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut. Nach einer weiteren Reinigung wurden Plasmid-DNA und PCR-Produkt mit T4-Ligase bei 16 °C über Nacht ligiert. Ein Teil des Ligationsansatzes wurde für eine Transformation in *E. coli* DH5α Zellen (chemisch kompetent) verwendet. Von einigen der durch Antibiotikaselektion entstandenen Klone wurde eine Plasmidpräparation durchgeführt und die Plasmide anschließend am HZI Braunschweig (Abteilung Genomanalytik) bzw. durch die Firma MWG (Ebersberg) sequenziert.

3.3.3 Zielgerichtete Mutagenese

In dieser Arbeit wurde das „QuikChange Site-directed mutagenesis kit“ von Stratagene verwendet um Punktmutationen zu generieren. Dazu wurden jeweils zwei Primer hergestellt (MWG Ebersberg), welche zueinander revers-komplementär waren, die Mutationsstelle in der Mitte trugen und eine Schmelztemperatur von mindestens 78 °C besaßen. Durch PCR wurde anschließend das gesamte Zielplasmid amplifiziert und die entsprechende Punktmutation eingefügt. Anschließend wurde das PCR-Produkt mit *DpnI* verdaut, einem Restriktionsenzym, welches spezifisch die methylierte Ursprungs-DNA

abbaut. Nach anschließender Transformation in *E. coli* DH5 α (chemisch-kompetente Zellen) wurden die noch vorhandenen Einzelstrangbrüche repariert. Von mehreren Klonen wurden die Plasmide präpariert und anschließend am HZI Braunschweig (Abteilung Genomanalytik) bzw. durch die Firma MWG (Ebersberg) sequenziert.

3.4 Produktion von rekombinanten Proteinen und deren Reinigung

3.4.1 Überexpression von rekombinanten Proteinen

Für die Überexpression von rekombinanten Proteinen wurden chemisch-kompetente *E. coli* Zellen frisch mit der entsprechenden Plasmid-DNA transformiert. Dazu wurden 25 ng Plasmid-DNA mit 100 μ l Zellen gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ansatz auf LB-Amp-Agarplatten (100 μ g/ml Ampicillin zur Plasmidselektion) ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Für die Übernachtskultur wurden 100 ml LB-Amp-Medium, mit einer Bakterienkolonie angeimpft und bei 37 °C und 120 rpm im Schüttler über Nacht inkubiert. Die Starterkultur im entsprechenden Medium für die Proteinproduktion wurde aus dieser Übernachtskultur 1:100 angeimpft und ebenfalls bei 37 °C bei 120 rpm inkubiert. Die weiterführenden Expressionsbedingungen hingen von dem jeweiligen Zielprotein ab und sind in Tabelle 12 zusammengefasst. Die Zellen wurden danach durch Zentrifugation (Sovall RC5-Zentrifuge) der Kultur für 20 min bei 6000 x g geerntet. Anschließend wurde das Zellpellet entweder für eine spätere Aufarbeitung bei -20 °C eingefroren oder direkt im Lysepuffer resuspendiert.

Tabelle 12: Expressionsbedingungen für rekombinante Proteine.

Protein	Medium	IPTG	Induktion	T	Expressionsdauer
CsgA-His ₆	TB	0,5 mM	OD ₆₀₀ ~1	37 °C	4 h
CsgE-His ₆ Wildtyp, alle Mutanten und GST-Fusionsproteine	TB bzw. CN040	1 mM	OD ₆₀₀ ~1-2	16 °C	18-20 h
CsgF-His ₆ Wildtyp und GST-CsgF Wildtyp	TB bzw. CN040	0,5 mM	OD ₆₀₀ ~1-2	16 °C	18-20 h
CsgG-His ₆	TB bzw. CN040	1 mM	OD ₆₀₀ ~1-2	37 °C	4 h

3.4.2 Markierung von rekombinanten Proteinen mit stabilen Isotopen

Für NMR-Experimente wurden die Proteine mit den stabilen Isotopen ^{15}N und ^{13}C markiert. Dies wurde durch Expression in Minimalmedium (CN040) erreicht. Die Übernachtskultur wurde, wie in Abschnitt 3.4.1 beschrieben, angesetzt. Die Starterkultur wurde zunächst in CN040-Medium ($^{12}\text{C}/^{14}\text{N}$) angeimpft und bei Erreichen von $\text{OD}_{600}\sim 1\text{-}2$ geerntet. Das Zellpellet wurde anschließend in markiertem CN040-Medium resuspendiert und für 30 min weiterinkubiert. Induktion und Expressionsdauer waren analog zu Tabelle 12.

3.4.3 Reinigung von CsgE-His₆

Das in dieser Arbeit hergestellte CsgE-His₆ und die CsgE-His₆ Varianten mit Punktmutationen wurden nativ in löslicher Form gereinigt. Zellpellets wurden in 300-400 ml IMAC-Zellysepuffer resuspendiert und mit einer Spatelspitze Lysozym für 30 min bei 4 °C zur Vorlyse inkubiert. Zum Entfernen genomischer DNA wurden 5 µg/ml DNase und 5 mM MgSO₄ zugefügt. Der Zellaufschluss wurde durch vier Passagen in einen Hochdruckhomogenisator (20 kPsi, 4 °C) erreicht. Zur Klärung wurde das Lysat für 45 min bei 37000 x g zentrifugiert. Für die Proteinreinigung wurde eine Affinitätschromatographie an immobilisierten Metallionen (Nickel-Sepharose) eingesetzt. Dazu wurde das klare Zelllysats mit 2-5 ml voräquilibrierter Nickelsepharose für eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die beladene Nickelsepharose bei Raumtemperatur (RT) in eine Säule gepackt und mit jeweils 25 Säulenvolumen (SV) von 10, 20, 30, 50 mM Imidazol in IMAC-Zellysepuffer gewaschen. Das gereinigte Protein wurde mit IMAC-Elutionspuffer eluiert. Ausbeute und Reinheit der einzelnen Elutionsfraktionen wurde mit einem SDS-PAGE analysiert. Proteinhaltige Fraktionen wurden vereint und Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur Verwendung wurde das Protein bei -80 °C gelagert.

3.4.4 Reinigung von CsgA-His₆

Die Reinigung von CsgA-His₆ und seiner Varianten mit Cysteinmutationen wurde denaturierend durchgeführt, da CsgA-His₆ als Einschlusskörperchen in *E. coli* hergestellt wurde. Geerntete Zellpellets wurden in 200-300 ml Denaturierungspuffer resuspendiert und über Nacht bei RT durch Rühren gelöst. Anschließend wurden die Zellen durch Sonifizierung für 30 min (1 s Puls, 2 s Pause, Sonotrode TT13/F2 Bandelin Sonopuls) weiter aufgeschlossen. Das Lysat wurde durch Zentrifugation bei 37000 x g für 45 min geklärt. Für die denaturierende Reinigung mit IMAC wurde das klare Zelllysats mit 2-3 ml voräquilibrierter Nickelsepharose für 1 Stunde bei RT inkubiert und anschließend die feste Phase in eine Säule überführt. Das gebundene Protein wurde mit jeweils 25 SV 10 und 20 mM Imidazol in Denaturierungspuffer gewaschen und anschließend mit 10 SV denaturierenden Elutionspuffer eluiert. Die Reinheit des Proteins wurde durch SDS-Page analysiert. Dazu wurden 2 µl Eluat mit 8 µl Wasser und 10 µl 4x SDS-Probenpuffer gemischt und aufgetragen. Proteinhaltige

Eluatfraktionen wurden vereint und für die anschließende Verwendung bei 4 °C gelagert oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

3.4.5 Reinigung von GST-Fusionsproteinen

In dieser Arbeit wurden GST-Fusionsproteine von CsgE Wildtyp und CsgE Punktmutanten als auch von CsgF hergestellt. GST-Fusionsproteine wurden nativ und löslich durch Affinitätschromatographie an immobilisiertem Glutathion gereinigt.

Die geernteten Zellpellets wurden in 300-400 ml GST-Zellysepuffer resuspendiert und mit einer Spatelspitze Lysozym versetzt. Der Ansatz wurde zur Vorlyse für eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Genomische DNA wurden durch die Zugabe von 5 µg/ml DNase und 5 mM MgSO₄ abgebaut. Durch vier Passagen im Hochdruckhomogenisator bei 4 °C wurden die Zellen aufgeschlossen. Anschließend wurde das Zellysat zur Klärung bei 37000 x g für 45 min zentrifugiert. Danach wurde das klare Zellysat mit 5 ml voräquilibrierter Glutathionagarose für eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Die feste Phase wurde anschließend in eine Säule gepackt und mit mindestens 50 SV GST-Zellysepuffer gewaschen. Im Anschluss wurde das gereinigte GST-Fusionsprotein mit 8-10 SV GST-Elutionspuffer eluiert. Ausbeute und Reinheit wurde durch SDS-PAGE analysiert. Für eine spätere Verwendung wurden die proteinhaltigen Eluatfraktionen vereint, mit 10 % Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

3.4.6 Proteolytische Spaltung von GST-Fusionsproteinen

Die Herstellung von tagfreiem CsgE F88S und CsgF erfolgte durch proteolytische Spaltung von GST-CsgE F88S bzw. GST-CsgF mit PreScission-Protease (PP) (GE Healthcare). Dazu wurde das gereinigte Fusionsprotein in 50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl dialysiert und anschließend mit 1 mM EDTA und 1 mM DTT versetzt. Für den proteolytischen Verdau wurden 2 U PP pro Milligramm Protein zugefügt und für mindestens 12 h bei 4 °C inkubiert. Der Verlauf der Spaltung wurde per SDS-PAGE verfolgt und bei unvollständiger Spaltung weiter fortgesetzt. Zur Abtrennung von GST und PP wurde der Spaltungsansatz mit voräquilibrierter Glutathionagarose inkubiert und nach reverser Affinitätschromatographie das im Durchlauf enthaltene Zielprotein aufgefangen.

3.4.7 Reinigung und Rückfaltung von CsgF-His₆

In dieser Arbeit wurde CsgF-His₆ denaturierend gereinigt und anschließend im immobilisierten Zustand auf der IMAC-Säule zurückgefaltet. Die Reinigung von CsgF-His₆ erfolgte analog zur Reinigung von CsgA-His₆ (siehe Abschnitt 3.4.4) allerdings ohne eine Elution des Proteins von der Säule. Nach dem letzten Waschschrift wurde CsgF-His₆ schrittweise zurückgefaltet. Dazu wurden jeweils 25 SV Rückfaltungspuffer (50 mM Tris pH 10, x M Guanidinium-HCl) mit stufenweise fallender Guanidiniumkonzentration (6 M, 4 M, 2 M und 0 M) verwendet. Anschließend wurde CsgF-His₆ nativ in Rückfaltungspuffer und

500 mM Imidazol eluiert. Ausbeute und Reinheit von rückgefaltetem CsgF-His₆ wurde durch SDS-PAGE analysiert. Für weiterführende Experimente wurde das Protein bei RT gelagert.

Im Falle von isotoopenmarkierten CsgF-His₆ wurde das Protein zunächst lyophilisiert um später im NMR-Messpuffer gelöst und rekonstituiert werden zu können. Dafür wurden die proteinhaltigen Eluatfraktionen vereint und gegen 1 % Essigsäure dialysiert. Anschließend wurde das Protein in Aliquots lyophilisiert und trocken bei RT gelagert.

3.4.8 Solubilisierung von CsgG-His₆

Das in dieser Arbeit verwendete CsgG-His₆ Konstrukt enthält das vollständige *csgG*₁₋₂₇₇-Gen. Überexprimiertes CsgG-His₆ wird Sec-abhängig ins Periplasma transportiert und anschließend in die äußere Membran eingebaut. Aus dieser kann es mithilfe von Detergenzien gelöst werden.

Zellpellets von CsgG-His₆ wurden in 200 ml 50 mM Tris pH 8, 300 mM NaCl resuspendiert mit einer Spatelspitze Lysozym, 5 µg/ml DNase und 5 mM MgSO₄ versetzt und für eine Stunde bei 4 °C rührend inkubiert. Der Zellaufschluss wurde mit vier Passagen im Hochdruckhomogenisator mit 20 kPsi bei 4 °C durchgeführt. Anschließend wurden alle unlöslichen Bestandteile bei 37000 x g für anderthalb Stunden abzentrifugiert. Die Solubilisierung von CsgG-His₆ aus der Membran erfolgte durch Zugabe von 3 % Elugent (Merck) und Rühren über Nacht bei 4 °C. Danach wurden wiederum nichtlösliche Bestandteile durch erneutes Zentrifugieren bei 37000 x g für anderthalb Stunden abgetrennt.

Klares CsgG-His₆ Solubilisat wurde anschließend direkt für die Pulldown-Experimente eingesetzt.

3.4.9 Gelfiltrationschromatographie

Einige der gereinigten Proteine wurden durch eine Gelfiltrationschromatographie (GFC) weiter gereinigt. Die Funktionsweise dieser beruht auf dem Molekularsiebprinzip. In einer Gelmatrix mit definierten Porengrößen wird das Protein aufgrund seiner Größe aufgetrennt. Größere Partikel können nicht so tief in das Labyrinth von Gelporen eindringen und eluieren somit zuerst. Ein wichtiger säulenspezifischer Parameter ist das Ausschlussvolumen (ein Drittel des Bettvolumens), in dem alle Proteine mit Molekulargewicht oberhalb der Auftrennungsgrenze eluiert werden. Die Auftrennungseigenschaften von Gelfiltrationssäulen hängen vor allem vom verwendeten Säulenmaterial ab. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Superdex 75 (3 kDa-70 kDa), Superdex 200 (10 kDa-600 kDa) und Superose 6 (5 kDa-5 MDa) Säulen in Verbindung mit einem Äkta-System (Purifier bzw. Explorer) von GE Healthcare verwendet.

Alle Lösungen in Verwendung mit Äkta-Systemen wurden standardmäßig filtriert (0,45 µm) und durch Ultraschall entgast. Die Reinigungen von löslichen Proteinen wurden stets bei 4 °C durchgeführt.

3.5 Proteinanalytik und Biophysikalische Methoden

3.5.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Proteine absorbieren ultraviolettes Licht im Bereich um 280 nm, wenn sie in ihrer Sequenz aromatische Aminosäuren wie Tryptophan oder Tyrosin besitzen. Bei dieser Absorption gilt das Gesetz von Lambert-Beer, welches die Extinktion in einen linearen Zusammenhang mit Konzentration und Schichtdicke des Stoffes bringt. Zur Skalierung dient der molare Extinktionskoeffizient ϵ . In Tabelle 13 sind die für diese Arbeit relevanten molaren Extinktionskoeffizienten aufgeführt. Die UV-Absorption wurde mit einem NanoDrop (Firma) bzw. UV-Vis-Spektrometer bei 280 nm gemessen.

Tabelle 13: Molare Extinktionskoeffizienten hergestellter Proteine.

Protein	ϵ [M⁻¹ cm⁻¹]
CsgA-His ₆ Wt und N46C, S55C, N136C	11460
CsgE-His ₆ Wt und D33A, D42A, R45S, E52A, R64S, R68S, D80A, F86S, F88S, R92S, D93A, E95A, F100S, E106A, E107A	19480
CsgE-His ₆ W69S, W72S	13980
CsgE-His ₆ Y44S	17990
GST-CsgE Wt und D33A, D42A, R45S, E52A, R64S, R68S, D80A, F86S, F88S, R92S, D93A, E95A, F100S, E106A, E107A	62590
GST-CsgE W69S, W72S	57090
GST-CsgE Y44S	61100
CsgE F88S	19480
CsgF-His ₆	4470
GST-CsgF Wt	47600
CsgF Wt	4470

3.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Reinheit der gereinigten Proteine wurde routinemäßig mit einer diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) unter reduzierenden Bedingungen analysiert (Laemmli 1970). Die Proteine werden durch Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert und erhalten eine gleichmäßige negative Ladung. Dadurch erfolgt die Auftrennung im Polyacrylamidgel exklusiv

anhand der Größe. Vor der SDS-PAGE wurden die Proteinproben mit SDS-Probenpuffer versetzt und aufgekocht. Proben die 8 M GuanidiniumHCl enthielten wurden vorher 1:5 mit Wasser verdünnt. Es wurde stets ein Novex® NuPAGE® SDS-PAGE Gel System (Invitrogen) in Verbindung mit 4-12 %igen Bis-Tris Midi Gelen, wie vom Hersteller beschrieben, verwendet (Hachmann & Amshey 2005). Proteinmolekulargewichtsmarker (siehe Tabelle 5) dienten als Vergleichsreferenz für die Proteinproben. Die Gele wurden anschließend mit InstantBlue (Expediton, Cambridgeshire, England) gefärbt, um die Proteine im Gel sichtbar zu machen. Zur Dokumentation wurden die gefärbten Proteingele mit einem handelsüblichen Flachbettscanner digitalisiert.

3.5.3 Western-Blot

Ein Western-Blot bezeichnet den Transfer von Proteinen aus einem Gel auf eine Membran. Diese Technik wurde in dieser Arbeit benutzt, um Proteine später durch spezifische Antikörper nachzuweisen. Zur Immobilisierung wurde eine Polyvinylidendifluoridmembran (PVDF) verwendet, welche für 5 sec in Methanol aktiviert und anschließend zusammen mit dem Proteingel und Whatmanpapier in Transferpuffer äquilibriert wurde. Der Aufbau des Blots war wie folgt: Whatmanpapier, Membran, Gel, Whatmanpapier. Der Transfer wurde halbtrocken bei 12 V für 30 min in einer Biorad Trans-Blot® SD Semi-Dry Box durchgeführt.

Nach dem Transfer wurde die Membran über Nacht mit einer 5 %igen Milchpulverlösung in TBS-T gesättigt, um unspezifische Wechselwirkungen des Antikörpers mit der Membran zu vermeiden. Um die His₆-markierten Proteine zu detektieren wurde ein Anti-His Antikörper (siehe Tabelle 3) verwendet, welcher direkt über eine Farbreaktion der konjugierten alkalinen Phosphatase (AP) nachgewiesen werden konnte. Der Antikörper wurde 1:20000 in 2,5 %iger Milchpulverlösung in TBS-T verdünnt und für mindestens 3 Stunden mit der Membran inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für 15 Minuten in TBS-T gewaschen und danach mit AP-Puffer äquilibriert. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 33 µl BCIP und 66 µl NBT (Promega) in 10 ml TBS-T gestartet und nach ausreichender Entwicklung durch Waschen mit Wasser gestoppt. Zur Dokumentation wurden die Membranen getrocknet und digitalisiert.

3.5.4 Dynamische Lichtstreuung von Proteinen

Die Methode der dynamischen Lichtstreuung (DLS) kann verwendet werden, um die Dispersität von Partikeln in Lösungen zu messen. Außerdem kann aus den Daten unter Berücksichtigung der Viskosität und der Temperatur der Diffusionskoeffizient und der hydrodynamische Radius berechnet werden. Bei der DLS wird Laserlicht von den Partikeln in Lösung gestreut. Die Intensität dieser Rayleigh-Streuung kann zeitaufgelöst aufgezeichnet werden, da sie durch die Molekularbewegung der Partikel beeinflusst wird. Nach einer Autokorrelation der Datenpunkte kann der Diffusionskoeffizient und daraus der hydrodynamische Radius R_D berechnet werden.

Da die Proteinlösungen staub- und aggregatfrei sein müssen, wurde das Protein vor der DLS für 15 Minuten bei 21000 x g zentrifugiert und anschließend sterilfiltriert (0,2 µm). Für die DLS-Messung wurden Proteinlösungen mit

mindestens 1 mg/ml in einer staubfreien DLS-Küvette (Eppendorf) verwendet. Die DLS-Messungen wurden mit einem DynaPro Titan in Kombination mit einem DynaPro Temperature-Controlled Microsampler (Wyatt Technology Cooperation) bei 25 °C durchgeführt. Die Leistung des Lasers wurde so gewählt, dass 2-3 Mio. counts/sec erreicht wurden. Die Messdaten wurden mit der Software Dynamics V6 (Wyatt Technology Cooperation) analysiert. Eine Dispersität von weniger als 15 % wurde als monodispers klassifiziert. Mit der Software konnte aus R_D auch das Molekulargewicht der Partikeln abgeschätzt werden. Dies wurde genutzt, um das Oligomerisierungsverhalten bzw. die Selbstassoziation von Proteinen und deren Mutanten zu untersuchen.

3.5.5 Thermofluor Assay

Um die Bindung von kleinen Molekülen an Proteine zu untersuchen wird oft ein Thermofluor Assay, auch *thermal shift assay* genannt, verwendet (Carver *et al.* 2005; Cummings *et al.* 2006). In diesem 96-well basierten Assay wird die Schmelztemperatur vom Zielprotein in Gegenwart von anderen Molekülen untersucht. Kommt es zu Interaktionen, verschiebt sich der Schmelzpunkt des Komplexes meist zu höheren Temperaturen. Diese Methodik kann aber auch eingesetzt werden, um den Schmelzpunkt von Proteinen in verschiedenen Puffer mit unterschiedlicher Ionenstärke oder verschiedenen Additiven systematisch zu analysieren, um den optimalen Puffer für strukturelle Untersuchungen zu finden (Ericsson *et al.* 2006). Meist korreliert die thermische Stabilität des Proteins dabei mit der Löslichkeit. Die Löslichkeit und Stabilität spielen eine große Rolle, sowohl in der Proteinkristallisation, als auch für NMR-Messungen, da für beide Methoden mit hohen Proteinkonzentrationen (> 5 mg/ml) gearbeitet werden muss. Im Thermofluor Assay werden die Proteine langsam aufgeheizt und geschmolzen. Der Schmelzpunkt wird dabei durch einen hydrophoben Farbstoff, SYPRO-Orange, detektiert, welcher sich bei der Aufschmelzung an exponierte hydrophobe Bereiche des Proteins anlagert und fluoresziert. In wässriger Umgebung ist diese Fluoreszenz unterdrückt.

Für die Durchführung wurde ein CFX96 Real-Time Thermal Cycler C1000 von BioRad verwendet. Der Temperaturgradient wurde in 0,5 °C Schritten von 10-90 °C programmiert.

Zunächst wurden die optimale Farbstoff- und Proteinkonzentration für den Thermofluor Assay gesucht. Verschiedene Farbstoff- (100x, 50x, 10x SYPRO-Orange) und Proteinkonzentrationen (2 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml) wurden im Ausgangspuffer gegeneinander getestet. Basierend darauf wurden anschließend im Hauptexperiment 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 3 bis 9 (Abstufung in halber pH-Einheit) mit 0 bis 500 mM NaCl (Abstufung 100 mM) verwendet. Ein Ansatz von gesamt 50 µl enthielt 40 µl Puffer, 5 µl Proteinlösung und 5 µl SYPRO-Orange-Lösung. Aus den Schmelzkurven wurden die Schmelzpunkte des Proteins, unter der jeweiligen Bedingung, mit der Software CFX (Biorad) berechnet. Die Schmelztemperatur wurde als Temperaturmatrix aus pH-Wert und Salzkonzentration dargestellt.

3.5.6 CD-Spektroskopie

Circulardichroismus (CD) beschreibt das Phänomen der unterschiedlichen Absorption zirkulär polarisierten Lichtes an chiralen Molekülen. Für Proteine führen β -Faltblattstrukturen und α -Helices aufgrund der unterschiedlichen Winkel der Peptidbindung zu charakteristischen CD-Spektren. Faltblattstrukturen zeigen ein typisches Minimum im CD-Signal bei 218 nm, helikale Strukturen besitzen zwei Minima, bei 208 nm bzw. 222 nm. Daher lässt sich CD einsetzen, um die Sekundärstrukturverteilung und Faltung von Proteinen zu analysieren.

Zu analysierende Proteine wurden vor der CD-Messung in einen salzfreien Phosphatpuffer dialysiert oder mit einer Nap5 Entsalzungssäule umgepuffert. Die Konzentration wurde auf 1 mM Amidbindung eingestellt. Für die Messung wurden CD-Küvetten mit 0,5 mm bzw. 1 mm Dicke von Hellma und eine JASCO J-810 CD-Spektrometer bei 25 °C verwendet. Das CD-Spektrum wurde in einem Bereich von 260-190 nm aufgezeichnet und mindestens zehn Messungen akkumuliert.

Neben der Analyse von Sekundärstrukturen von Proteinen, kann mit CD-Spektroskopie auch die Schmelztemperatur von Protein bestimmt werden (Greenfield 2007). Dazu wird das Protein im CD-Spektrometer aufgeschmolzen und das CD-Signal an einer für das Protein charakteristischen Wellenlänge verfolgt. Dies wurde in dieser Arbeit für CsgE-His₆, CsgE W69S und CsgE F88S angewendet, um den Einfluss der Punktmutationen auf die thermodynamische Stabilität zu untersuchen. Dazu wurden die gereinigten Proteine gegen 50 mM KPi pH 7,2 und 150 mM NaF dialysiert. Anschließend wurde jeweils eine Konzentration von 1 mM Amidbindung (molare Proteinkonzentration x Anzahl der Aminosäuren) eingestellt. Zum Aufschmelzen wurde ein Temperaturgradient von 5 bis 90 °C in 0,2 °C Schritten verwendet. Das CD-Signal wurde bei 222 nm aufgezeichnet. Aus der Schmelzkurve konnten anschließend durch Kurvenregression der Schmelzpunkt des Proteins und der Entfaltungsverlauf (Anteil des ungefalteten zu gefalteten Proteins) bestimmt werden.

3.6 *In vivo* Komplementation

In der *in vivo* Komplementation wird ein Zielgen in *E. coli* ausgeschaltet oder entfernt und anschließend ein homologes Zielgen *in trans* von einem entsprechenden Plasmid exprimiert. Es wird untersucht, ob die *in trans* Expression des homologen Gens den Phänotyp des Wildtyps komplementieren kann. In dieser Arbeit wurde dieses Prinzip verwendet, um verschiedene Punktmutationen in CsgE auf ihre Funktionalität hin *in vivo* zu analysieren.

CsgE vollständiger Länge (1-129) wurde in einen pLR2 kloniert, welcher für die Expression den natürlichen Curlipromotor des *csgBAC* Operons benutzt. Anschließend wurden die Punktmutationen W69S, W72S und F88S durch QuikChange PCR eingefügt. Die Plasmide wurden in eine Δ *csgE*-Mutante von *E. coli* M4100 (MHR480) transformiert und auf KR-YESCA-Agarplatten ausgestrichen. Die Platten wurden bei 26 °C für zwei Tage inkubiert, um die Curlibildung zu induzieren. Anschließend wurden die Zellen von der Platten geerntet, in Phosphatpuffer resuspendiert und auf OD₆₀₀=1 normalisiert. Zweimal 100 μ l der Zellsuspension wurden für 20 Minuten in der Zentrifuge pelletiert. Anschließend wurde ein Pellet mit SDS-Probenpuffer behandelt, das andere mit Hexafluoroisopropanol (HFIP) gelöst, getrocknet und ebenfalls in SDS-

Probenpuffer gelöst. Alle Proben wurden in einem 15 %igen Gel per SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend per Westernblot über Nacht bei 4 °C mit 12 V in 25 mM CAPS, pH 11,2 auf eine PVDF-Membran übertragen. Danach wurde die Membran über Nacht bei 4 °C in 1x TBST und 1,5 % Milch blockiert. Antikörper gegen CsgA, CsgE bzw. CsgG wurden 1:5000 in Blockierlösung verdünnt und zur Detektion der entsprechenden Proteine für eine Stunde bei RT mit der Membran inkubiert. Ein Meerrettichperoxidase konjugierter Sekundärantikörper (Pierce) wurde 1:5000 verdünnt für eine Stunde bei RT in Blockierlösung zugegeben. Die Detektion erfolgte über Supersignal West Femto chemiluminescent substrate (Pierce).

3.7 Protein-Protein Interaktionsstudien

3.7.1 CsgA-Autoaggregation und Thioflavin T Fluoreszenz

Die Hauptcurliuntereinheit CsgA kann, wie in Abschnitt 1.5 beschrieben wurde, auch selbstständig *in vitro* Amyloidfibrillen bilden. Dabei findet eine strukturelle Konversion vom vorher ungefalteten Zustand (Zufallsknäuel) in eine β -faltblattreiche Proteinfibrille statt. Diese Autoaggregation kann mithilfe amyloidbindender Farbstoffe, wie des Benzothiazols Thioflavin T (ThT, siehe Abbildung 10), nachgewiesen werden. Bei der Bindung von ThT an Amyloidstrukturen verstärkt sich dessen Fluoreszenz und es kommt zu einer typischen Rotverschiebung des Emissions- und Absorptionsspektrums.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von CsgE-Wildtyp, CsgE W69S und CsgE F88S auf die Autoaggregation von CsgA durch ThT-Fluoreszenz untersucht. Dazu wurden die CsgE-Proteine, wie in Abschnitt 3.4.3 beschrieben, gereinigt und anschließend gegen 50 mM KPi-Puffer pH 8 dialysiert. CsgA wurde, wie in Abschnitt 3.4.4 beschrieben, frisch hergestellt und erst kurz vor der Mischung mit CsgE entsalzt. Vorher wurde CsgA im denaturierenden Puffer bei 120000 x g ultrazentrifugiert, um eventuelle Aggregate zu entfernen. Zum Entsalzen von CsgA wurden eine Nap5-Entsalzungssäule und der oben genannte Puffer benutzt. Entsalztes CsgA wurde mit CsgE in verschiedenen Verhältnissen (0,5:1; 1:1; 2:1) gemischt, wobei die Konzentration von CsgA stets 10 μ M betrug. Als Kontrollen wurden die einzelnen Proteine CsgA, CsgE Wildtyp, CsgE W69S und CsgE F88S jeweils allein zu je 10 μ M verwendet. Jedem Ansatz wurden noch 20 μ M ThT zugegeben. Alle Ansätze wurden in vier analytischen Replikaten auf einer 96-well Platte (Corning #3650, flat bottom, black Polystyrene) aufgetragen und mit einem Tecan Plattenleser M1000 (Tecan Group Ltd, Männedorf, Schweiz) bei 25 °C für ca. 48 h vermessen. Die Anregungswellenlänge betrug 442 nm mit 5 nm Bandbreite, die Emissionswellenlänge betrug 485 nm mit 5 nm Bandbreite. Die Platte wurde alle 10 min für 5 sec geschüttelt und anschließend ausgelesen. Im Anschluss an das Experiment wurden die Datenpunkte mit der Software Excel (Microsoft) ausgewertet.

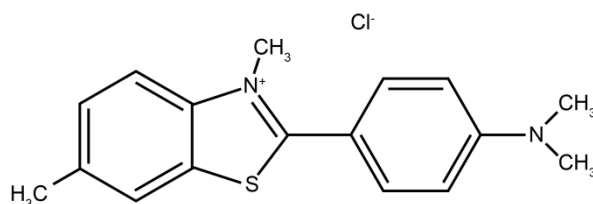


Abbildung 10: Struktur von Thioflavin T.

3.7.2 CsgG-His₆ Pulldown

Eine Methode direkte Protein-Protein-Interaktionen qualitativ zu untersuchen, besteht darin einen der Bindungspartner zu immobilisieren und anschließend die Bindung des freien Bindungspartners nachzuweisen. In dieser Arbeit wurde dieser sogenannte Pulldown vor allem dazu verwendet, zu untersuchen, ob die Bindung zwischen GST-CsgE und CsgG-His₆ durch Mutationen in der Struktur von CsgE verändert wird. Die Bindung von CsgG-His₆ wurde mit einem anti-Hexahistidin-Antikörper detektiert.

Dazu wurde CsgG-His₆, wie in Abschnitt 3.4.8 beschrieben, hergestellt. Als immobilisiertes Köderprotein wurden Fusionsproteine aus GST und CsgE und dessen Mutanten verwendet. Diese wurden, wie in Abschnitt 3.4.5 beschrieben, gereinigt und anschließend durch GFC in 50 mM Tris pH 8, 300 mM NaCl weitergereinigt (siehe Abschnitt 3.4.9).

Zwei Milligramm GST-CsgE Fusionsprotein wurde für eine Stunde bei 4 °C mit 2 ml voräquilibrierter Glutathionagarose inkubiert und immobilisiert. Anschließend wurde die feste Phase in einer Säule gepackt und der Durchlauf verworfen. Das immobilisierte GST-CsgE Fusionsprotein wurde danach mit 5 SV Pulldownpuffer (50 mM Tris pH 8; 300 mM NaCl; 1 % Eluent) äquilibriert.

Das immobilisierte GST-CsgE Fusionsprotein wurde anschließend mit 25 ml des klaren CsgG-Solubilisats bei 4 °C inkubiert. Die feste Phase wurde erneut in eine Säule gepackt und der Durchlauf verworfen. Der gebildete GST-CsgE/CsgG-Komplex wurde mit 25 SV Pulldownpuffer gewaschen und anschließend mit 50 mM reduziertem Glutathion im Pulldownpuffer eluiert.

Jeweils eine Probe der ersten Fraktion (3 ml) wurde per SDS-PAGE und Westernblot (anti-Hexahistidin Antikörper) analysiert.

3.7.3 Detektion von CsgE-CsgA Interaktion mit NMR

Um die Wechselwirkung zweier Moleküle in Lösung genauer zu charakterisieren, kann NMR-Spektroskopie eingesetzt werden. Wenn die Interaktion nur schwach und transient ist, behilft man sich oft einer Methode, die als *paramagnetic relaxation enhancement* (PRE) bekannt ist (Clöre *et al.* 2007). Dazu wird einer der Bindungspartner, der in diesem Falle nicht mit Isotopen markiert ist, mit einer paramagnetischen Sonde markiert. Der zweite Bindungspartner ist mit ¹⁵N-Isotopen markiert, sodass dieser NMR-spektroskopisch sichtbar wird. Kommt es zu einer Interaktion beider Moleküle führt die paramagnetische Sonde in ihrer näheren Umgebung zur schnelleren Relaxation von Kernspins im zweiten Molekül. Dies spiegelt sich in einer Linienverbreiterung und damit verbundenen

Intensitätsabnahme der entsprechenden Resonanzen wieder. Durch Zuordnung der Resonanzen kann somit die Interaktionsstelle auf dem isotoopenmarkierten Bindungspartner lokalisiert werden.

In dieser Arbeit wurde PRE eingesetzt, um die Interaktion zwischen CsgA und CsgE genauer zu charakterisieren. Dafür wurde die paramagnetische Sonde MTSL verwendet, die über eine reaktive Thionatgruppe an reduzierte Cysteinreste im Protein (CsgA) angebracht wurde.

3.7.3.1 PRE-NMR von CsgA-CsgE Wildtyp bei pH 3

Die CsgA Cysteinmutanten CsgA N46C, CsgA S55C und CsgA N136C (Plasmide von Agnes Zimmer, HZI, Braunschweig) wurden wie in Abschnitt 3.4.4 hergestellt. Für die Markierung mit MTSL wurde das Protein unter denaturierenden Bedingungen in einer Konzentration von mindestens 250 μM verwendet und mit 10 mM DTT für 1 h bei RT reduziert. Durch Umpuffern in 50 mM KPi pH 7,2 und 8 M GuanidiniumHCl mit einer NAP5-Entsalzungssäule wurde das DTT wieder entfernt und anschließend wurde MTSL (in DMSO gelöst) im fünffachen molaren Überschuss zum Protein zugegeben und über Nacht inkubiert. Danach wurde mit Phosphorsäure ein pH-Wert von 3 eingestellt. Kurz vor dem Mischen mit CsgE wurde CsgA-MTSL über eine NAP5-Entsalzungssäule in 25 mM KPi pH 3 gebracht.

Mit ^{15}N -Isotopen markiertes CsgE Wildtyp wurde, wie in Abschnitt 3.4.2 beschrieben, hergestellt und gegen 25 mM KPi pH 3 dialysiert. Als NMR-Probe wurden 100 μM ^{15}N CsgE Wildtyp mit 100 μM CsgA-MTSL bei pH 3 gemischt und 6% D_2O zugesetzt. Anschließend wurde ein 2D ^{15}N -HSQC-Spektrum (2048x192; 4 Scans) von CsgE Wildtyp bei 25 °C gemessen. Als Referenz wurde ein HSQC-Spektrum von 100 μM ^{15}N CsgE Wildtyp ohne CsgA-MTSL unter gleichen Bedingungen vermessen. Der gesamte Vorgang wurde für jede der CsgA Cysteinmutanten wiederholt.

Zur Auswertung wurden alle NMR-Spektren mit TopSpin 2.1 (Bruker) prozessiert und anschließend mit Cara (Keller 2004) analysiert. Signalvolumina wurden durch Integration mit einheitlichem Peakmodell berechnet.

3.7.3.2 PRE-NMR von CsgA-CsgE W69S bei pH 6,5

Die Vorbereitung von CsgA-MTSL (für CsgA N46C, CsgA S55C, CsgA N136C) erfolgte analog wie für die PRE-Experimente bei pH 3 allerdings ohne pH 3 einzustellen. Erst kurz vor dem Mischen mit CsgE W69S wurde das Protein in 50 mM KPi pH 6,5 entsalzt und anschließend 250 mM NaCl zugefügt.

^{15}N CsgE W69S wurde, wie in Abschnitt 3.4.2 beschrieben, hergestellt und danach gegen 50 mM KPi pH 6,5 mit 250 mM NaCl dialysiert. Als NMR-Probe wurden 20 μM entsalztes CsgA-MTSL mit 100 μM ^{15}N CsgE W69S gemischt und 6 % D_2O zugefügt. Für jede Probe wurde ein 2D ^{15}N -HSQC-Spektrum (2048x192; 4 Scans) bei 18 °C aufgenommen. Anschließend wurde die gesamte Probe mit 400 μM Ascorbinsäure versetzt, um den PRE-Effekt des MTSL auszulöschen. Dabei wird das freie radikale Elektron von MTSL auf Ascorbinsäure übertragen. Als Referenz wurde davon ebenfalls ein 2D ^{15}N -HSQC-Spektrum gemessen.

Die Auswertung der Messdaten erfolgte analog dem PRE-Experiment bei pH 3.

3.7.4 CsgE/CsgA Coaggregation

Das Aggregationsverhalten von CsgE und CsgA wurde in Mischungen beider Proteine durch Analyse der Lösung mit Trennung des löslichen und unlöslichen Proteins untersucht.

Dazu wurden CsgE Wildtyp, CsgE W69S und CsgE F88S als His₆-tag Fusionsproteine hergestellt (siehe Abschnitt 3.4.3). CsgA Wildtyp wurde denaturierend gereinigt (siehe Abschnitt 3.4.4) und kurz vor dem Entsalzen bei 120000 x g ultrazentrifugiert. CsgE Wildtyp, CsgE W69S und CsgE F88S wurden über Nacht bei 4 °C gegen 50 mM KPi pH 8 dialysiert. CsgA wurde mit einer Nap5-Entsalzungssäule ebenfalls in 50 mM KPi pH 8 entsalzt. CsgE Wildtyp, CsgE W69S und CsgE F88S wurden 1:1 zu je 10 µM mit entsalztem CsgA gemischt. Als Kontrollen wurden alle vier Proteine ebenfalls zu je 10 µM verwendet. Die Ansätze wurden anschließend in 1,5 ml Reaktionsgefäßen aufgeteilt (für jede Probe und jeden Zeitpunkt zwei separate Gefäße mit 100 µl des jeweiligen Ansatzes) und in einem temperaturkontrollierten Schüttler bei 25 °C mit Schüttelintervallen alle 10 min für 5 s inkubiert. Proben wurden zu Beginn und nach zwei, vier, sechs, acht und fünfzehn Stunden genommen und für 10 min bei 21000 x g zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen. Für jeden Zeitpunkt und jede CsgE-Variante wurden drei Proben erzeugt. Eine Probe vom Überstand wurde 1:1 mit 4fach SDS-Probenpuffer gemischt. Ein Pellet wurde mit 50 µl 4fach SDS-Proben gelöst. Ein zweites Pellet wurde erst in 50 µl Ameisensäure (100 %) gelöst, in einem SpeedVac Vakuumkonzentrator getrocknet und anschließend ebenfalls in 50 µl 4fach SDS-Proben gelöst. Für die SDS-PAGE wurden von jeder Probe 10 µl aufgetragen.

3.8 Kernmagnetresonanzspektroskopie

3.8.1 Generelles Vorgehen NMR-Messung

Allen Proben wurde kurz vor der Messung 6 % D₂O zugefügt, welches als Leitsignal für das *Locken* der Probe im Spektrometer benötigt wird. Es wurden 520 µl bis 550 µl der Probe in ein NMR-Röhrchen (Norell® Typ 508UP) gefüllt und verschlossen.

Nach Äquilibration der NMR-Probe im Spektrometer bei der gewünschten Temperatur (ca. 10 min), wurde zunächst der *offset* (Frequenz maximaler Amplitude des Protonenbreitbandpulses) und anschließend die Pulslängen zur optimalen Anregung der Protonen anhand von 1D-Experimenten bestimmt. Für 3D-Experimente von ¹³C/¹⁵N-markierten Proteinen wurden auch die Kohlenstoff- und Stickstoffpulslänge optimiert.

Nach erfolgter Messung wurden alle Proben für eine evtl. spätere Messung bei 4 °C gelagert.

3.8.2 Screening von Messbedingungen

Um die optimalen Messbedingungen für die NMR-Spektroskopie zu finden, wurden die gereinigten Proteine in verschiedene Pufferlösungen mit unterschiedlichen pH-Werten und unterschiedlichen Ionenstärken gebracht. Dies wurde entweder durch Umpuffern mit einer Nap5-Entsalzungssäule erreicht oder durch Dialyse. Im Falle von unmarkierten Proteinen wurden 1D Protonspektren aufgezeichnet und analysiert. Die Linienbreite und spektrale Dispersion der Resonanzen gab Aufschluss über die Faltung und den oligomeren Zustand des Proteins.

Waren die Proteine mit dem Isotop ¹⁵N markiert, wurden 2D ¹⁵N -HSQC-Spektren gemessen und analysiert. Ein ¹⁵N-HSQC-Experiment korreliert alle Amidprotonen und die kovalent gebundenen Stickstoffkerne des Proteins miteinander. Anhand der Auflösung und spektralen Dispersion des HSQCs lässt sich abschätzen, ob eine Strukturaufklärung unter den entsprechenden Bedingungen möglich ist. Zusätzlich wurde auch die Messtemperatur variiert und optimiert. Das Ergebnis der Messung wurde qualitativ analysiert.

3.8.3 Probenvorbereitung CsgE Wildtyp pH 3

Eingefrorene Proben von ¹³C/¹⁵N markiertem CsgE Wildtyp (Herstellung siehe Abschnitt 3.4.2) wurden aufgetaut und durch die Zugabe von 200 mM Kaliumphosphatpuffer pH 2,5 ein pH-Wert von 3 eingestellt. Anschließend wurde der Ansatz gegen 25 mM Kaliumphosphatpuffer pH 3 dialysiert. Danach wurde das Protein mit einem Vivaspin Konzentrator (10 kDa; Sartorius) auf über 1 mM Proteinkonzentration aufkonzentriert. Es folgte ein letzter Dialyseschritt gegen 25 mM Kaliumphosphat pH 3, 0,05 % NaN₃.

3.8.4 Probenvorbereitung CsgE W69S pH 6,5

Eingefrorene Proben von $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ markiertem CsgE W69S wurden aufgetaut und gegen 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,5, 250 mM NaCl, 0,05 % NaN_3 dialysiert. Die Proteinkonzentration wurde anschließend mit dem Dialysepuffer auf 250-350 μM eingestellt.

3.8.5 Probenvorbereitung ^{15}N CsgF

Zunächst wurde ^{15}N markiertes GST-CsgF hergestellt (siehe Abschnitt 3.4.2 und Abschnitt 3.4.5) welches anschließend, wie in Abschnitt 3.4.6 beschrieben, proteolytisch gespalten und gereinigt wurde. Danach wurde ^{15}N CsgF auf über 100 μM mit einem Vivaspin Konzentrator (10 kDa; Sartorius) eingengt. Aliquots zu 500 μl von ^{15}N CsgF wurden jeweils in unterschiedliche Puffer (vgl. Abbildung 36) mit einer NAP5-Entsalzungssäule umgepuffert.

3.8.6 Probenvorbereitung $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ CsgF-His₆

Acht bis neun Milligramm lyophilisiertes $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ CsgF-His₆ (Herstellung siehe Abschnitt 3.4.7) wurde in 600 μl 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,5, 100 mM DHPC, 0,05 % NaN_3 , 6 % D_2O durch leichtes Schütteln bei 45 °C im Thermoschüttler für 45 min gelöst und anschließend nichtlösliche Proteinaggregate bei 21000 x g abzentrifugiert. Die Proteinkonzentration wurde gemessen und auf 400 μM mit selbigem Puffer eingestellt.

3.8.7 Übersicht zu gemessenen NMR-Datensätzen und Parametern

Für die Messung von NMR-Datensätzen wurden folgende Spektrometer verwendet: Bruker 600 MHz Avance III in Verbindung mit einem 5 mm Z-Gradient Triple-Resonanz Kryoprobekopf (HZI- Braunschweig), Bruker 900 MHz Avance in Verbindung mit einem 5 mm TCI Z-Gradient Kryoprobekopf (FMP Berlin). Die Messbedingungen für Proteinproben, welche letztendlich für die Resonanzzuordnung benutzt wurden sind in Tabelle 14 zusammengefasst. Details zu Akquisitionsparameter und verwendeten Pulsprogrammen für Experimente zur Resonanzzuordnung und Strukturaufklärung beinhalten Tabelle 15, Tabelle 16 und Tabelle 17.

Material und Methoden

Tabelle 14: Übersicht über NMR-Datensätze zur Resonanzzuordnung. Proteinkonzentration c_P , Temperatur T.

Protein	Isotope	Puffer	c_P	T	NMR-Datensatz
CsgE-His ₆	¹³ C/ ¹⁵ N	25 mM KPi pH 3; 0,05 % NaN ₃	1,2 mM bzw. 750 µM (für NOESY)	25 °C	¹⁵ N-HSQC, ¹³ C-HSQC (Aliphaten), ¹³ C-HSQC (Aromaten), HN(CO)CA, HNCA, HNCACB, HHN- TOCSY, HHN-NOESY, HHC- NOESY (Aliphaten), HHC- NOESY (Aromaten), HHC- TOCSY(Aliphaten)
CsgE W69S	¹³ C/ ¹⁵ N	50 mM KPi pH 6,5; 250 mM NaCl; 0,05 % NaN ₃	300 µM	18 °C und 25 °C	¹⁵ N-HSQC, ¹³ C-HSQC (Aliphaten), HN(CO)CA, HNCA, HNCACB, HHN- NOESY, HHC- NOESY(Aliphaten)
CsgF-His ₆	¹³ C/ ¹⁵ N	50 mM KPi pH 6,5; 100 mM DHPC; 0,05 % NaN ₃	400 µM	37 °C	¹⁵ N-HSQC, HNCO, HN(CA)CO, CBCA(CO)NH, HNCACB, HCC(CO)NH, CN- NOESY, HHN-NOESY, HHN-TOCSY
CsgF-His ₆	¹³ C/ ¹⁵ N	50 mM KPi pH 6,5; 100 mM d22-DHPC; 0,05 % NaN ₃	400 µM	37 °C	¹⁵ N-HSQC, ¹³ C-HSQC (Aliphaten), ¹³ C-HSQC (Aromaten), HHC- NOESY(Aliphaten), HHC- NOESY(Aromaten), HHC- TOCSY(Aliphaten)

Material und Methoden

Tabelle 15: Übersicht Akquisitionsparameter und verwendete Pulsprogramme für CsgE Wildtyp pH 3. Mischzeit Mz, Anzahl an Scans NS.

Experiment	Akquisitionszeit (ms)			Mz (ms)	NS	Pulsprogramm
	t ₁	t ₂	t ₃			
¹⁵ N-HSQC	63,1 (¹⁵ N)	244,7 (¹ H)	-	-	4	NHSQC_3-9-19 (Mori <i>et al.</i> 1995)
¹³ C-HSQC (Aliphaten)	18,2 (¹³ C)	244,7 (¹ H)	-	-	4	CHSQC_3-9-19 (Mori <i>et al.</i> 1995) (modifiziert aus NHSQC_3-9-19)
¹³ C-HSQC (Aromaten)	42,4 (¹³ C)	122,4 (¹ H)	-	-	4	CHSQC_3-9-19 (Mori <i>et al.</i> 1995) (modifiziert aus NHSQC_3-9-19)
HN(CO)CA	19,9 (¹³ C)	23,5 (¹⁵ N)	243,4 (¹ H)	-	8	hncocagpwg3d (Grzesiek & Bax 1992)
HNCA	19,9 (¹³ C)	23,5 (¹⁵ N)	243,4 (¹ H)	-	8	hncagpwg3d (Grzesiek & Bax 1992)
HNCACB	10,6 (¹³ C)	23,5 (¹⁵ N)	243,4 (¹ H)	-	16	hncacbgpwg3d (Wittekind & Mueller 1993)
HHN-NOESY	20,7 (¹ H)	42,1 (¹⁵ N)	85,2 (¹ H)	50	4	NOESY-HHN (Marion <i>et al.</i> 1989)
HHC-NOESY (Aliphaten)	21,3 (¹ H)	5,7 (¹³ C)	85,2 (¹ H)	50	4	NOESY-HHC (Marion <i>et al.</i> 1989) modifiziert aus NOESY-HHN
HHC-NOESY (Aromaten)	21,3 (¹ H)	10,6 (¹³ C)	85,2 (¹ H)	50	4	NOESY-HHC (Marion <i>et al.</i> 1989) modifiziert aus NOESY-HHN
HHN-TOCSY	21,3 (¹ H)	42,1 (¹⁵ N)	113,6 (¹ H)	60	4	modifiziertes NOESY-HHN (Marion <i>et al.</i> 1989) mit Dipsi2 Mischsequenz (Shaka <i>et al.</i> 1988)
HHC-TOCSY (Aliphaten)	21,3 (¹ H)	10,3 (¹³ C)	113,6 (¹ H)	60	4	modifiziertes NOESY-HHC (Marion <i>et al.</i> 1989) mit Dipsi2 Mischsequenz (Shaka <i>et al.</i> 1988)

Tabelle 16: Übersicht Akquisitionsparameter und verwendete Pulsprogramme für CsgE W69S bei pH 6,5. Mischzeit Mz, Anzahl an Scans NS.

Experiment	Akquisitionszeit (ms)			Mz (ms)	NS	Pulsprogramm
	t ₁	t ₂	t ₃			
¹⁵ N-HSQC	78,9 (¹⁵ N)	122,4 (¹ H)	-	-	16	NHSQC_3-9-19 (Mori <i>et al.</i> 1995)
¹³ C-HSQC (Aliphaten)	18,2 (¹³ C)	122,4 (¹ H)	-	-	16	CHSQC_3-9-19 (Mori <i>et al.</i> 1995) (modifiziert aus NHSQC_3-9-19)
HN(CO)CA	16,6 (¹³ C)	20,5 (¹⁵ N)	60,9 (¹ H)	-	8	hncocagpwg3d (Grzesiek & Bax 1992)
HNCA	20,7 (¹³ C)	20,5 (¹⁵ N)	121,7 (¹ H)	-	16	hncagpwg3d (Grzesiek & Bax 1992)
HNCACB	10,6 (¹³ C)	20,5 (¹⁵ N)	243,4 (¹ H)	-	16	hncacbgpwg3d (Wittekind & Mueller 1993)
HHN-NOESY	21,3 (¹ H)	43,8 (¹⁵ N)	85,2 (¹ H)	80	4	NOESY-HHN (Marion <i>et al.</i> 1989)
HHC-NOESY (Aliphaten)	22,0 (¹ H)	6,3 (¹³ C)	85,2 (¹ H)	80	8	NOESY-HHC (Marion <i>et al.</i> 1989) modifiziert aus NOESY-HHN
HHC-TOCSY (Aliphaten)	25,1 (¹ H)	7,8 (¹³ C)	56,8 (¹ H)	60	8	modifiziertes NOESY-HHC (Marion <i>et al.</i> 1989) mit Dipsi2 Mischsequenz (Shaka <i>et al.</i> 1988)

Material und Methoden

Tabelle 17: Übersicht Akquisitionsparameter und verwendete Pulsprogramme für CsgF-His₆ bei pH 6,5. Mischzeit Mz, Anzahl an Scans NS.

Experiment	Akquisitionszeit (ms)			Mz (ms)	NS	Pulsprogramm
	t ₁	t ₂	t ₃			
¹⁵ N-HSQC	114,8	122,4 (¹ H)	-	-	4	NHSQC_3-9-19 (Mori <i>et al.</i> 1995)
¹³ C-HSQC (Aliphaten)	26,5 (¹³ C)	61,2 (¹ H)	-	-	2	CHSQC_3-9-19 (Mori <i>et al.</i> 1995) (modifiziert aus NHSQC_3-9-19)
¹³ C-HSQC (Aromaten)	42,4 (¹³ C)	122,4 (¹ H)	-	-	12	CHSQC_3-9-19 (Mori <i>et al.</i> 1995) (modifiziert aus NHSQC_3-9-19)
HNCO	17,6 (¹³ C)	17,9 (¹⁵ N)	121,7 (¹ H)	-	8	hncogpwg3d (Grzesiek & Bax 1992)
HN(CA)CO	22,0 (¹³ C)	20,9 (¹⁵ N)	121,7 (¹ H)	-	16	hncacogpwg3d (Clubb <i>et al.</i> 1992)
CBCA(CO)NH	6,2 (¹³ C)	17,9 (¹⁵ N)	121,7 (¹ H)	-	12	cbcaconhgpwg3d (Grzesiek & Bax 1993)
HNCACB	7,6 (¹³ C)	17,9 (¹⁵ N)	121,7 (¹ H)	-	16	hncacbgpwg3d (Wittekind & Mueller 1993)
(H)CC(CO)NH	6,1 (¹³ C)	20,3 (¹⁵ N)	53,3 (¹ H)	20	32	hccconhgpwg3d3 (Montelione <i>et al.</i> 1992; Grzesiek <i>et al.</i> 1993; Lyons & Montelione 1993)
CN-NOESY	6,4 (¹³ C)	20,3 (¹⁵ N)	60,9 (¹ H)	80	24	noesyncgp3d (Diercks <i>et al.</i> 1999)
HHN-NOESY	20,1 (¹ H)	28,7 (¹⁵ N)	85,2 (¹ H)	80	8	NOESY-HHN (Marion <i>et al.</i> 1989)
HHN-TOCSY	20,1 (¹ H)	20,3 (¹⁵ N)	56,8 (¹ H)	50	16	modifiziertes NOESY-HHN (Marion <i>et al.</i> 1989) mit Dipsi2 Mischsequenz (Shaka <i>et al.</i> 1988)
HHC-NOESY (Aliphaten)	20,9 (¹ H)	7,0 (¹³ C)	42,6 (¹ H)	80	8	NOESY-HHC (Marion <i>et al.</i> 1989)
HHC-NOESY (Aromaten)	21,3 (¹ H)	6,0 (¹³ C)	85,2 (¹ H)	80	4	NOESY-HHC (Marion <i>et al.</i> 1989)
HHC-TOCSY (Aliphaten)	20,9 (¹ H)	6,6 (¹³ C)	113,6 (¹ H)	60	8	modifiziertes NOESY-HHC (Marion <i>et al.</i> 1989) mit Dipsi2 Mischsequenz (Shaka <i>et al.</i> 1988)

3.8.8 Datenprozessierung und Auswertung

Alle NMR-Daten wurden mit der Software Prosa Version 6.3 (Güntert *et al.* 1992) im xeasy-Format prozessiert. Die Datenpunkte der gemessenen Zeitdomäne des FID werden dabei durch Fouriertransformation in frequenzabhängige Datenpunkte umgewandelt. Durch so genanntes *zerofilling* (meist Verdopplung der Datenpunkte jeder Dimension) wurde die digitale Auflösung erhöht. Als Fensterfunktionen wurden für die direkte Dimension Sinus 90° und für die indirekten Dimensionen Sinus Quadrat 90° verwendet. Die Basislinie wurde durch verschiedene prosainterne Funktionen, wie „cft“, „cftw“ und „cflat“ korrigiert.

Für die Auswertung und Visualisierung der prozessierten Daten wurde die Software Cara (Keller 2004) verwendet. Mit dieser wurden alle Schritte der Resonanzzuordnung manuell durchgeführt.

3.8.9 Zuordnung von Resonanzen des Proteinerückgrates

Um NMR-Daten später für die Berechnung der Proteinstruktur benutzen zu können, müssen zunächst möglichst viele Resonanzen des Proteinerückgrates und der Seitenketten zugeordnet werden.

Begonnen wurde mit der Zuordnung von Spinsystemen, das heißt alle Spins (H, N, CO, CA, CB) die zu einer Aminosäure gehören wurden gruppiert. Als Grundlage dafür dienten Tripleresonanzspektren, wie HNCO, HNCA, HN(CO)CA, HN(CA)CO, CBCA(CO)NH und HNCACB als auch ein 2D ¹⁵N-HSQC-Spektrum.

Die in den einzelnen Experimenten enthaltenen Spinkorrelationen sind in Tabelle 18 zusammengefasst. In Kombination liefern diese Spektren Informationen über ein Spinsystem (i) und über das benachbarte Spinsystem (i-1). Über einen Abgleich der chemischen Verschiebung von Cα und Cβ bzw. CO wurden die Spinsysteme miteinander verknüpft. Ein verknüpfter Abschnitt an Spinsystemen weist ein charakteristisches Muster an chemischen Verschiebungen auf, welches im Abgleich mit der *Biological magnetic resonance bank* (BMRB, www.bmrb.wisc.edu) einem bestimmten Abschnitt im Protein zugeordnet wurde. Aufgrund des fehlenden Amidprotons von Prolinen werden diese in HN-detektierten Experimenten nicht abgebildet und bilden eine Lücke in der Zuordnung.

Tabelle 18: Spinkorrelationen in gemessenen Tripleresonanzspektren.

Experiment	Korrelation	Protein
HNCO	H _(i) , N _(i) , CO _(i-1)	CsgF-His ₆
HN(CA)CO	H _(i) , N _(i) , CO _(i)	CsgF-His ₆
HN(CO)CA	H _(i) , N _(i) , Cα _(i-1)	CsgE-His ₆ , CsgE W69S
HNCA	H _(i) , N _(i) , Cα _(i-1) , Cα _(i)	CsgE-His ₆ , CsgE W69S
HNCACB	H _(i) , N _(i) , Cα _(i-1) , Cβ _(i-1) , Cα _(i) , Cβ _(i)	CsgE-His ₆ , CsgE W69S, CsgF-His ₆
CBCA(CO)NH	H _(i) , N _(i) , Cα _(i-1) , Cβ _(i-1)	CsgF-His ₆

3.8.10 Zuordnung von Resonanzen der Proteinseitenketten

Nach der Zuordnung des Proteintrückgrates konnte die Zuordnung der Proteinseitenketten erfolgen. Dazu wurden die in Tabelle 19 aufgeführten 3D TOCSY und 3D NOESY Spektren in Kombination mit 2D ^{15}N -HSQC- und 2D ^{13}C -HSQC-Spektren verwendet. Zunächst wurden die $\text{H}\alpha$ - und $\text{H}\beta$ -Spins der einzelnen Spinsysteme im HHN-TOCSY bzw. HHN-NOESY-Spektrum zugeordnet. Basierend auf diesen wurden Protonspins und Kohlenstoffspins der Seitenketten in Kohlenstoff-editierten TOCSY- und NOESY-Spektren zugeordnet. Für die Zuordnung von aromatischen Seitenketten wurde ein separates HHC-NOESY (Aromaten) verwendet.

Tabelle 19: Spinkorrelationen in gemessenen TOCSY- und NOESY-Spektren.

Experiment	Korrelation	Protein
HHN-TOCSY	$\text{H}_{(i)}$, $\text{N}_{(i)}$, $\text{Hx}_{(i)}$	CsgE-His ₆ , CsgE W69S, CsgF-His ₆
HHC-TOCSY (Aliphaten)	$\text{H}_{(i)}$, $\text{C}_{(i)}$, $\text{Hx}_{(i)}$	CsgE-His ₆ , CsgE W69S, CsgF-His ₆
HHN-NOESY	$\text{H}_{(i)}$, $\text{N}_{(i)}$, $\text{Hx}_{(i)}$, $\text{Hx}_{(j)}$,	CsgE-His ₆ , CsgE W69S, CsgF-His ₆
HHC-NOESY (Aliphaten)	$\text{H}_{(i)}$, $\text{C}_{(i)}$, $\text{Hx}_{(i)}$, $\text{Hx}_{(j)}$,	CsgE-His ₆ , CsgE W69S, CsgF-His ₆
HHC-NOESY (Aromaten)	$\text{H}_{(i)}$, $\text{C}_{(i)}$, $\text{Hx}_{(i)}$, $\text{Hx}_{(j)}$,	CsgE-His ₆ , CsgF-His ₆
(H)CC(CO)NH	$\text{H}_{(i)}$, $\text{N}_{(i)}$, $\text{Cx}_{(i-1)}$	CsgF-His ₆

3.8.11 Strukturrechnung

Für die Berechnung von Proteinstrukturen basierend auf NMR-Daten in Lösung (für CsgE-His₆ bei pH 3 und CsgF-His₆ bei pH 6,5) wurde die Software UNIO '10 Version 2.0.2. (Guerry & Herrmann 2012) benutzt. Diese kombiniert die Algorithmen ATNOS (*automated NOESY peak picking*) (Herrmann *et al.* 2002) und CANDID (*Combined automated NOE assignment and structure determination*) (Herrmann *et al.* 2002) und den molekularen Torsionsdynamik (MD) Algorithmus CYANA 2.1 (Güntert *et al.* 1997). Mit ATNOS wurden NOESY-Signale automatisch gepickt und durch CANDID anschließend zugeordnet. Danach wurden vom MD-Algorithmus 100 Strukturen durch *simulated annealing* (simulierte Abkühlung) in 10000 Einzelschritten im Vakuum berechnet. Die 20 Strukturen mit der niedrigsten Zielfunktion wurden für den nächsten Zyklus benutzt. Es wurden insgesamt sieben iterative Zyklen von NOESY-Signалуordnung und Strukturrechnung durchlaufen.

3.8.12 Strukturverfeinerung

Die erzeugten Proteinstrukturen wurden mit den Programmen molmol (Koradi *et al.* 1996) und Pymol (DeLano Scientific Llc) visuell analysiert. Für die manuelle Strukturverfeinerung wurden die durch den letzten Zyklus der Strukturrechnung erzeugten *upper distance limits* (UPL) mit den 3D-NOESY-Daten verifiziert und gegebenenfalls die Signalzuordnung korrigiert. Außerdem wurde versucht die Zahl der Verletzungen von Bedingungen durch Korrektur des Assignments zu minimieren. Manuelle Strukturverfeinerung und Strukturrechnung wurden ebenfalls iterativ durchgeführt, bis der geordnete Teil des Proteins einen RMSD von weniger als 1 Å für das Proteinrückgrat und die Zielfunktion einen Wert weniger als 10 Å² hatten.

Nachdem keine weitere Verbesserung der Strukturen und deren Statistiken mehr erreicht werden konnte, wurden die Strukturen umgeben von Wasser verfeinert. Dieser Schritt ist als Wasserverfeinerung bekannt. Als Software wurde CNS-solve Version 1.2 (Brunger *et al.* 1998) in Verbindung mit dem Protokoll von Linge *et al.* verwendet ((Linge *et al.* 2003; Nederveen *et al.* 2005). Zunächst wurden 200 Strukturen mit CNS-solve erneut berechnet, wovon die 50 energieärmsten anschließend in Wasser verfeinert wurden. Letztendlich wurden die 20 verfeinerten Strukturen geringster Energie selektiert.

Zur Validierung der NMR-Strukturen wurde der iCING-Server (nmr.cmbi.ru.nl/cing/icing.html) verwendet (Doreleijers *et al.* 2012).

3.9 Röntgenstrukturanalyse

3.9.1 Generelles Kristallisationsscreening

Für das Screening von Kristallisationsbedingungen wurden die kommerziellen Screens JCSG I, JCSG II, JCSG III und JCSG IV der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Ein Honeybee 961 Kristallisationsroboter (Zinsser Analytics, Frankfurt am Main) hat 200 nl des konzentrierten Proteins mit dem gleichen Volumen an Reservoirlösung auf einer 96-well Intelli-Plate[®] (Art Robbins Instruments, Sunnyvale, CA) gemischt. Die Kristallisation wurde im sitzenden Tropfen durchgeführt. Die Platten wurden mit Manco[™] Crystal Clear Tape (Jena Bioscience, Jena) versiegelt und bei 18 °C, 12 °C bzw. 4 °C gelagert. Während der ersten Woche wurde jeden zweiten Tag das Wachstum von Kristallen überprüft, später einmal wöchentlich.

3.9.2 Proteinkristallisation von CsgE F88S

GST-CsgE F88S wurde, wie in Abschnitt 3.4.5 beschrieben, gereinigt und anschließend mit PP (siehe Abschnitt 3.4.6) zur Abspaltung von GST verdaut. CsgE F88S wurden über eine Gelchromatographie (siehe Abschnitt 3.4.9) mit einer Superdex 200 16/60 Säule in 20 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl aufgereinigt. Die Fraktionen mit CsgE F88S wurden über einen Vivaspin 10 kDa Konzentrator auf 27 mg/ml eingeeengt.

3.9.3 Fischen von Kristallen und Kryokristallographie

Da Röntgenstrahlung zu Strahlungsschäden im Kristall führen kann (Garman & Owen 2005) wurden die Datensätze bei Tieftemperatur (ca. 100 K) aufgenommen. Um zu vermeiden, dass sich Eiskristalle bilden, die zu Artefakten in Form von Eisingen im Beugungsmuster führen, wurde eine Kryoschutzbedingung benutzt. Dazu wurde der Mutterlösung der Kristalle noch 20 % Glycerin zugesetzt und diese darin für wenige Sekunden inkubiert. Anschließend wurden die Kristalle in flüssigem Stickstoff schockgekühlt und entweder in flüssigem Stickstoff gelagert oder gleich vermessen. Die Kristalle wurden an der HZI-eigenen Röntgenquelle (Rigaku MicroMax-007 HF Trianodengenerator mit CCD-Detektor) getestet.

3.9.4 Datenakquisition und Prozessierung

Hochauflösende Datensätze wurden in Hamburg an der P11 beamline von PETRA III gemessen. Es wurde ein vollständiger Datensatz über 360° in Schritten zu je 0,5° aufgenommen. Der Datensatz wurde mit dem Programm XDS (Kabsch 2010) indiziert und skaliert. Außerdem wurde der Datensatz anisotropiekorrigiert (services.mbi.ucla.edu/anisoscale/, (Strong *et al.* 2006)).

3.9.5 Molekularer Ersatz

Das Phasenproblem in der Proteinkristallisation kann, wie in Abschnitt 1.7.1 beschrieben, sowohl experimentell als auch durch molekularen Ersatz (MR) gelöst werden. Da in dieser Arbeit nur MR verwendet wurde, wird dieser hier genauer erklärt.

Die Grundvoraussetzung für MR ist das Vorhandensein eines Strukturmodells, das der Zielstruktur sehr ähnlich ist. Oft werden dafür homologe Proteine mit bekannter Struktur und hoher Sequenzidentität verwendet. Die Annahme dabei ist, dass die Phasen des homologen Proteins annähernd den realen Phasen entsprechen. Die Vorteile von MR bestehen in der Schnelligkeit, geringen Kosten und der Möglichkeit zur Automatisierung. Der Erfolg von MR hängt in erster Linie davon ab, wie gut das Suchmodell zu den experimentellen Daten passt. Ebenso wichtig ist die Bewertung einzelner Lösungen während der Suche.

Beim MR werden die Phasen des Suchmodells aus der bekannten Struktur durch Fourier Rücktransformation berechnet und versucht damit die experimentellen Daten bestmöglich zu interpretieren. Das Suchmodell wird dazu virtuell in der asymmetrischen Einheit platziert und durch Rotation und Translation in insgesamt sechs Dimensionen bewegt. Alle in der asymmetrischen Einheit befindlichen Moleküle müssen gefunden werden. Die Geschwindigkeit dieser Suche kann gesteigert werden, indem im Pattersonraum zuerst nur durch Rotation versucht wird, die richtige Orientierung zu finden und im Anschluss durch Translation eine mögliche Position bestimmt wird. Zur Bewertung von Treffern der Suche existieren zwei Methoden, die Korrelationsmethode und die *maximum-likelihood* Methode (Evans & McCoy 2007). Bei der Korrelationsmethode wird die Pattersonfunktion des Suchmodells und der gemessenen Daten erst durch Rotation und anschließend durch Translation zu korreliert (Rossmann & Blow 1962; Tollin & Rossmann 1966; Evans & McCoy 2007). Bei der *maximum-likelihood* Methode werden die Reflektionen als unabhängig angesehen, sodass die Wahrscheinlichkeiten für die Translations- und die Rotationsfunktion dem Produkt der Wahrscheinlichkeiten aller Reflektionen entsprechen. Als Zielfunktion wird meist der negative Logarithmus der Wahrscheinlichkeit (*-log-likelihood*) zur Suche von Lösungen verwendet (Read 2001; McCoy 2004).

Für den MR von CsgE F88S wurde in dieser Arbeit die Lösungsstruktur von CsgE Wildtyp bei pH 3 verwendet. Als Suchmodell wurde ein Polyserinmodell generiert (die energieärmste berechnete Struktur vor der Verfeinerung in Wasser), aus dem die flexiblen Bereiche des N- und C-Terminus und die Schleifen entfernt wurden. Der MR wurde mit dem Programm Phenix.automr (Adams *et al.* 2010) durchgeführt, bis die entsprechende Anzahl an Monomeren in der asymmetrischen Einheit gefunden war. Als Zielfunktion wurde *-log-likelihood* verwendet. Die gefundene Lösung wurde mit Phenix.mr_ROSETTA (DiMaio *et al.* 2011) durch alternierendes Bauen und Relaxieren verfeinert. Für Treffer mit maximaler Zielfunktion wurde die Elektronendichte mit COOT (Emsley *et al.* 2010) visualisiert und versucht zu verfeinern. Bei erfolgreicher erster Verfeinerung wurde von einem erfolgreichen MR ausgegangen.

3.9.6 Modellbau, Verfeinerung und Validierung

Der Modellbau wurde manuell mit COOT (Emsley *et al.* 2010) durchgeführt. Die Verfeinerung erfolgte mit Phenix.refine (Adams *et al.* 2010) unter Kontrolle der Bindungslängen, Bindungswinkel, Planarität und Chiralität. Die atomaren Temperaturfaktoren (B-Faktoren) wurden als isotrop behandelt. In den letzten Verfeinerungsschritten wurde auch TLS-Verfeinerung (*translation libration screw motion*) zur Kompensation anisotroper Domänenbewegung verwendet. Mehrere iterative Zyklen von Modellbau und Verfeinerung wurden durchlaufen, wobei auf konvergierende R-Werte geachtet wurde. Zunächst wurden die Aminosäuren des Proteins anschließend Liganden (Ionen) und Wassermoleküle in die Elektronendichte gebaut.

Zur Validierung der Gesamtstruktur wurde die Ramachandranstatistik (Ramachandran & Sasisekharan 1968) mit Procheck (Laskowski *et al.* 1993) und die Torsionswinkel mit COOT (Emsley *et al.* 2010) auf Ausreißer überprüft, welche gegebenenfalls entfernt wurden. Die Strukturgeometrie (Bindungslängen und Bindungswinkel) wurde mit Molprobit (Chen *et al.* 2010) analysiert.

4 Ergebnisse

4.1 Biophysikalische und strukturelle Charakterisierung von CsgE Wildtyp

4.1.1 Konstrukt- und Strategiewahl

Um die Molekularstruktur von Proteinen aufzuklären kann entweder Röntgenstrukturanalyse oder NMR eingesetzt werden (siehe auch Abschnitt 1.7). Ein Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Struktur von CsgE. Die Strategie, die dafür gewählt wurde, ist in Abbildung 11 dargestellt. Ausgewählte Proteinkonstrukte werden zunächst rekombinant hergestellt und gereinigt. Nachdem die Proteinstabilität charakterisiert und bezüglich der Pufferbedingungen optimiert wurde (Untersuchung verschiedenster pH-Werte und Salzkonzentrationen), wird eine Proteinkristallisation versucht. Falls dies nicht erfolgreich ist, wird auch die Möglichkeit untersucht, das Protein durch NMR zu charakterisieren und möglicherweise die Lösungsstruktur zu ermitteln.

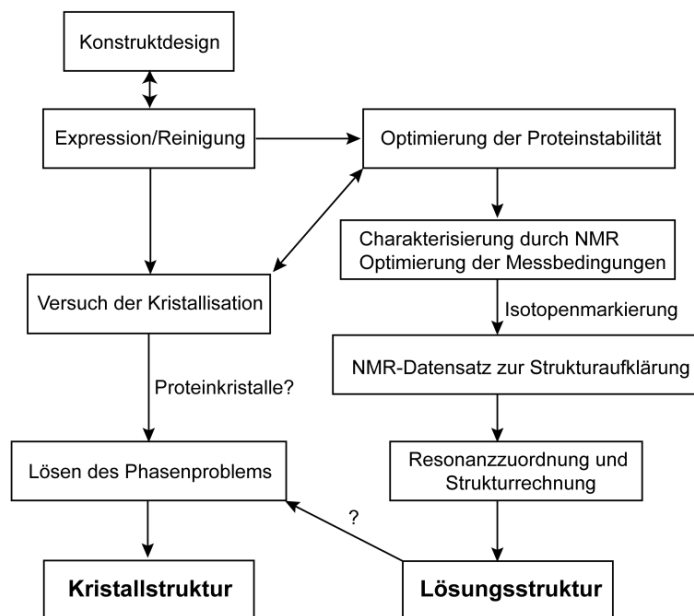


Abbildung 11: Generelle Strategie zur Strukturaufklärung von Proteinen.

Da CsgE ein *E. coli*-eigenes Protein ist, wurde *E. coli* auch als Expressionssystem ausgewählt und ein CsgE-Konstrukt bestehend aus den Aminosäuren 22-129 in

einen pET11d-Vektor mit C-terminalen Hexahistidintag (His_6) kloniert (im weiteren bezeichnet als „CsgE- His_6 “). CsgE- His_6 wurde ohne die Reste 1-21 kloniert, da diese durch den Algorithmus SignalP 3.0 (www.cbs.dtu.de/services/SignalP/) als Sec-Signalsequenz identifiziert wurden und für eine zytoplasmatische Überexpression von CsgE- His_6 entfernt werden mussten (Nielsen *et al.* 1997).

4.1.2 Expression und Reinigung von CsgE- His_6

CsgE- His_6 konnte in *E. coli* in großen Mengen überexprimiert werden (siehe Abbildung 12). Die Reinigung über Affinitätschromatographie an Nickel-Sepharose (siehe Material und Methoden, Abschnitt 3.4.3) führte zu reinem CsgE- His_6 , ein proteolytischer Abbau des Proteins war nicht zu beobachten.

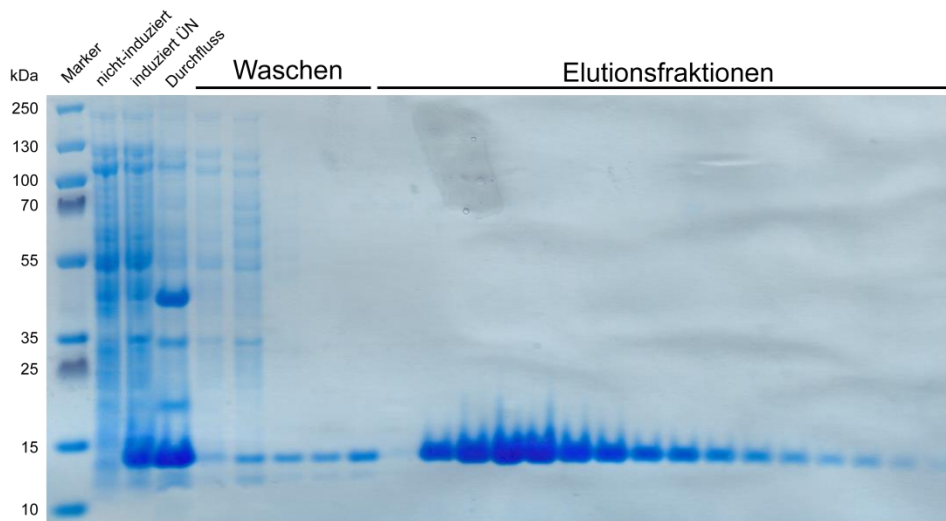


Abbildung 12: Expression und Reinigung von CsgE- His_6 . Das SDS-PAGE-Gel gefärbt mit Coomassie zeigt die Expression über Nacht (ÜN) von CsgE- His_6 (13,3 kDa). Die Elutionsfraktionen enthalten ausschließlich CsgE- His_6 .

Die Ausbeute betrug mehr als 100 mg CsgE- His_6 pro Liter TB-Medium bzw. 50 bis 60 mg CsgE- His_6 pro Liter Minimalmedium (CN040).

Allerdings war anschließend zu beobachten, dass CsgE- His_6 bei Raumtemperatur im Elutionspuffer (50 mM KPi pH 7,2; 150 mM NaCl; 500 mM Imidazol) innerhalb einiger Stunden fast vollständig präzipitierte. Dies ließ sich durch Lagerung bei 4 °C und durch die Zugabe von Glycerin verzögern.

4.1.3 Thermodynamische Stabilität von CsgE-His₆

Da für strukturbiochemische Analysen eine hohe Stabilität des Proteins Voraussetzung war, wurde für CsgE-His₆ die thermodynamische Stabilität in Lösung anhand der Schmelztemperatur untersucht. Dafür wurde ein Thermofluor Assay, auch *thermal shift assay* genannt, verwendet. Die Schmelztemperatur wurde in unterschiedlichen pH-Werten und Salzkonzentrationen gemessen. Das Ergebnis ist als Temperaturkarte in Abbildung 13 dargestellt. Schmelztemperaturen von über 50 °C zeigte CsgE-His₆ bei pH-Werten zwischen 5 und 6,5 in Gegenwart von mindestens 100 mM NaCl. Die maximale Schmelztemperatur von über 60 °C zeigte CsgE-His₆ bei pH 3 und geringer Ionenstärke. Niedrige Schmelzpunkte von unter 30 °C fanden sich von pH 7 bis 8 bei niedriger Ionenstärke und außerdem bei pH 3 und hoher Ionenstärke (500 mM Salz). Die thermodynamisch stabilsten Bedingungen für das Protein schienen somit bei pH 3 und niedriger Ionenstärke bzw. zwischen pH 5 bis 6 und hoher Ionenstärke zu liegen.

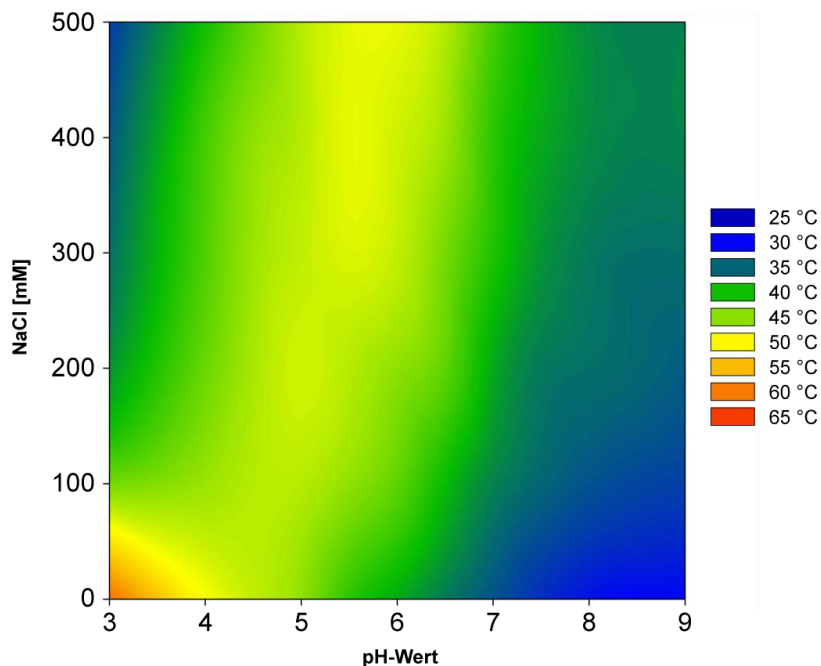


Abbildung 13: Thermodynamische Stabilität von CsgE-His₆. Thermofluor Assay zur Bestimmung der Schmelztemperatur von CsgE in Abhängigkeit von pH-Wert (Phosphatpuffer) und Ionenstärke.

Anschließend wurde untersucht inwieweit das Schmelzverhalten des Proteins mit der Löslichkeit korrelierte. Dazu wurde CsgE-His₆ in eine Reihe verschiedener Puffer gebracht, vergleichbar mit den im Thermofluor Assay verwendeten, und die

Löslichkeit anhand von makroskopischen Beobachtungen (klare Lösung oder Präzipitation), verfolgt. Es zeigte sich, dass CsgE-His₆ im pH-Wertbereich zwischen 3,5 bis 6,0 vollständig unlöslich war, das heißt sehr rasch präzipitiert, unabhängig von der Ionenstärke. Dazu ist festzustellen, dass der berechnete isoelektrische Punkt von CsgE-His₆ bei 5,6 lag. Im Bereich oberhalb von pH 6 stieg die Löslichkeit des Proteins mit der Salzkonzentration an, allerdings war eine langsame Präzipitation stets zu beobachten. Eine besonders hohe Löslichkeit und Stabilität, auch bei Raumtemperatur, wurde für CsgE-His₆ in KPi pH 3 mit geringer Ionenstärke beobachtet. Dies bedeutete, dass CsgE-His₆ nur bei pH 3 sowohl thermodynamisch besonders stabil als auch sehr gut löslich war.

4.1.4 Versuch der Kristallisation von CsgE-His₆

Um eine Molekularstruktur durch Röntgenstrukturanalyse aufklären zu können, müssen Kristalle des entsprechenden Proteins vorhanden sein. Dazu müssen zuerst Bedingungen gefunden werden, in denen das Protein kristallisiert.

Dazu wurde CsgE-His₆ zunächst per Dialyse in 20 mM Tris-Puffer pH 8, 250 mM NaCl bzw. in 20 mM Natriumcitratpuffer pH 3 gebracht. Die Proteinkonzentration wurde auf 6 mg/ml und 12 mg/ml eingestellt und ein generelles Kristallisationsscreening (siehe Abschnitt 3.9.1) durchgeführt.

Nach dem Mischen der Lösung war für die höhere Proteinkonzentration die Anzahl klarer Tropfen und Tropfen mit Präzipitat ungefähr gleich, was erfahrungsgemäß auf eine optimale Proteinkonzentration für eine Kristallisation hindeutet. Bei der regelmäßigen visuellen Kontrolle der Tropfen (bis zu sechs Monaten) konnten aber keine Proteinkristalle oder mikrokristallinen Strukturen beobachtet werden. Die Struktur von CsgE-His₆ konnte daher durch Röntgenstrukturanalyse zunächst nicht gelöst werden.

4.1.5 Charakterisierung der Selbstassoziation von CsgE-His₆

Der Oligomerisierungszustand von Proteinen in ihrer nativen Umgebung ist vielfältig. Manche Proteine sind als Monomer funktional, andere werden als Oligomer aktiv. Auch die Stabilität eines Proteins kann mit der Quartärstruktur zusammenhängen, da eine Oligomerisierung eine gegenseitige Stabilisierung oder

Ergebnisse

auch Destabilisierung der Proteinmoleküle bewirken kann. Für die strukturb biologischen Methoden Röntgenstrukturanalyse und Lösungs-NMR ist der Oligomerisierungszustand aber ebenfalls interessant, da polydisperses Partikelverhalten eine Kristallisation verhindern kann bzw. große Partikeln sehr schnell relaxieren und zu sehr breiten (unscharfen) Spektrallinien in der NMR führen. Eine Strukturaufklärung von CsgE-His₆ durch Lösungs-NMR wäre daher nur als Monomer, Dimer evtl. Trimer denkbar.

Um die Selbstassoziation von CsgE-His₆ in Lösung zu untersuchen, wurde DLS eingesetzt. Die Partikelgröße wurde in verschiedenen Puffern untersucht, das Ergebnis ist in Tabelle 20 dargestellt. Das aufgrund der Proteinsequenz berechnete Molekulargewicht (MG) von monomeren CsgE-His₆ betrug 13,3 kDa. Das aus dem gemessenen hydrodynamischen Radius (R_D) berechnete Molekulargewicht von mehr als 86 kDa bei pH-Werten zwischen 7 und 8 wies auf einen oligomeren Zustand von CsgE-His₆ unter diesen Bedingungen hin. Im Gegensatz dazu lag das Protein bei pH 3 als Monomer (gemessen 18 kDa) vor. Die Abweichung zu höheren Werten in der Berechnung durch den Algorithmus, kam durch die Annahme eines perfekt globulären Proteins zustande.

Tabelle 20: Hydrodynamischer Radius und Polydispersität von CsgE-His₆ in verschiedenen Puffern. Ergebnis der DLS-Messung zur Bestimmung des hydrodynamischen Radius R_D und der Polydispersität PD. Das Molekulargewicht MG wurde aus R_D unter Annahme eines globulären Partikels berechnet (Programm: Dynamics Version 6.10.1.2 von Wyatt Tech. Co.).

Puffer	R_D in [nm]	PD in [%]	MG in [kDa]
25 mM KPi pH 3	2,1	8,8	18
50 mM KPi pH 7	4,2	7,2	98
50 mM KPi pH 7; 250 mM NaCl	4,0	12,8	86
50 mM KPi pH 7,4; 150 mM NaCl (2 Signale)	4,2 18,9	10 4,4	98 3257
50 mM Tris pH 8	5,1	23,5	150
50 mM Tris pH 8; 250 mM NaCl	5,8	29,1	203

Durch eine analytische Gelfiltrationschromatographie (GFC) auf einer kalibrierten Superdex-200 Säule wurde das Molekulargewicht von CsgE-His₆ in 50 mM KPi pH 7,2 mit 500 mM NaCl auf ca. 68 kDa bestimmt (nicht dargestellt), was einem tetra- oder pentamerischen Zustand des Proteins entsprach. Eine GFC von CsgE-

Ergebnisse

His₆ bei pH 3 mit geringer Ionenstärke (0 mM NaCl) blieb ohne Ergebnis, da es scheinbar zur Adsorption des Proteins an das Säulenmaterial kam.

Des Weiteren wurde die Selbstassoziation von CsgE bei unterschiedlichem pH-Wert durch NMR untersucht und in Form von 2D ¹⁵N-HSQC-Spektren analysiert. Dazu wurde CsgE-His₆ mit dem Isotop ¹⁵N markiert und in Phosphatpuffer pH 8 bzw. pH 3 bei 25 °C gemessen. Die entsprechenden 2D ¹⁵N-HSQC-Spektren sind in Abbildung 14 dargestellt.

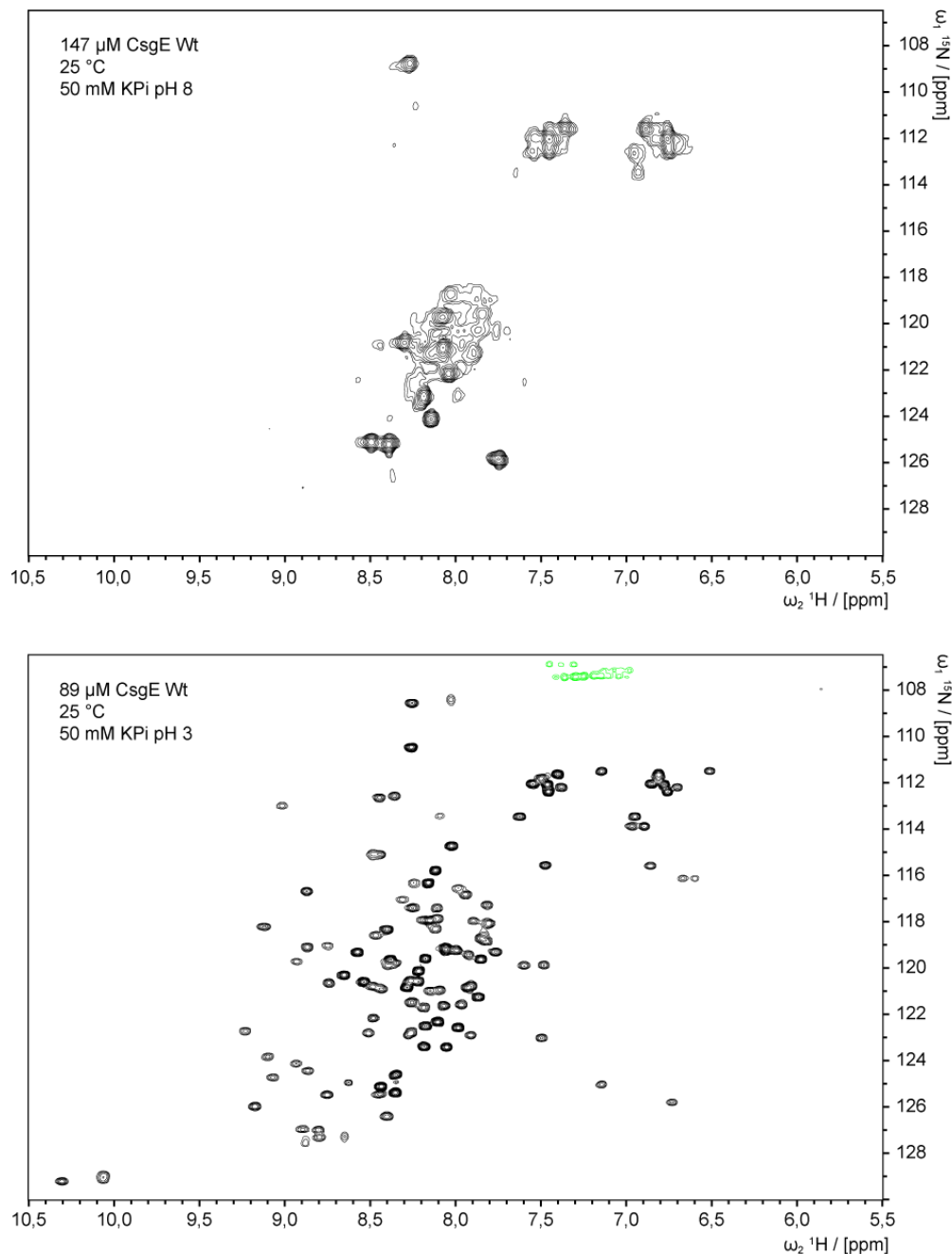


Abbildung 14: 2D ¹⁵N-HSQC Spektren von CsgE-His₆ bei unterschiedlichem pH.

Oben: ¹⁵N CsgE-His₆ in 50 mM KPi pH 8 bei 25 °C. Spektrale Linienbreite für repräsentative Signale ca. 45 Hz. **Unten:** ¹⁵N CsgE-His₆ in 50 mM KPi pH 3 bei 25 °C. Spektrale Linienbreite für repräsentative Signale ca. 26 Hz. grün: gefaltete Signale. (Spektrometer: 600 MHz Bruker Avance III).

Das HSQC-Spektrum bei pH 8 zeigte nur ca. 14 der erwarteten 111 Resonanzen des Proteinerückgrates. Die geringe spektrale Dispersion von ca. 0,7 ppm um die Mitte des Spektrums ließ darauf schließen, dass es sich um hochflexible Bereiche des Proteins handelte, wahrscheinlich N- und/oder C-Terminus. Der Rest des Proteins schien spektral nicht abgebildet zu sein. Wahrscheinlich lag das Protein bei pH 8 als Oligomer in Lösung vor, wobei die meisten Resonanzen durch T_2 -Relaxation so stark verbreitert waren, dass sie verschwanden. Das HSQC-Spektrum bei pH 3 zeigte mindestens 103 Resonanzen des Proteinerückgrates mit einer spektralen Dispersion von ca. 3,5 ppm. Eine Linienbreite von ca. 26 Hz (bei pH 8 ca. 45 Hz) deutete einen monomeren Zustand des Proteins an, wie es auch schon die DLS-Ergebnisse zuvor zeigten.

4.1.6 Strategie zur Aufklärung der Lösungsstruktur von CsgE-His₆

Wie im vorherigen Abschnitt gezeigt wurde, lag CsgE-His₆ bei pH 3 wahrscheinlich als Monomer in Lösung vor und wies eine hohe thermodynamische Stabilität auf. Diese Eigenschaften machten eine Strukturaufklärung durch Lösungs-NMR möglich.

Die gewählte Strategie zur Strukturlösung ist in Abbildung 15 dargestellt. Das Protein wurde durch Expression in Minimalmedium mit ^{13}C - und ^{15}N -Isotopen markiert und nach der Reinigung auf pH 3 gebracht (Material und Methoden Abschnitt 3.4.2 und Abschnitt 3.8.3). Die Proteinkonzentration wurde so hoch wie möglich eingestellt, da sie direkt mit der Signalintensität im NMR-Spektrum korreliert und betrug 1,2 mM für die Messung der Tripleresonanz- und TOCSY-Spektren. Für die NOESY-Experimente wurde die Proteinkonzentration auf 750 μM gesenkt, da dies zu etwas schmalere Spektrallinien führte, wahrscheinlich aufgrund geringerer Viskosität oder weniger ausgeprägter Selbstassoziation bedingt durch die sehr hohe Proteinkonzentration.

Die vollständige Datensammlung erforderte mehrere Wochen Messzeit und somit eine stabile Proteinprobe. Es wurde festgestellt, dass CsgE-His₆ eine hohe Langzeitstabilität bei pH 3 besitzt, so dass insgesamt nur zwei Proben benötigt wurden. Eine Übersicht über die gemessenen Spektren und die Prozessierung findet sich in „Material und Methoden“ Abschnitt 3.8.7 und Abschnitt 3.8.8.

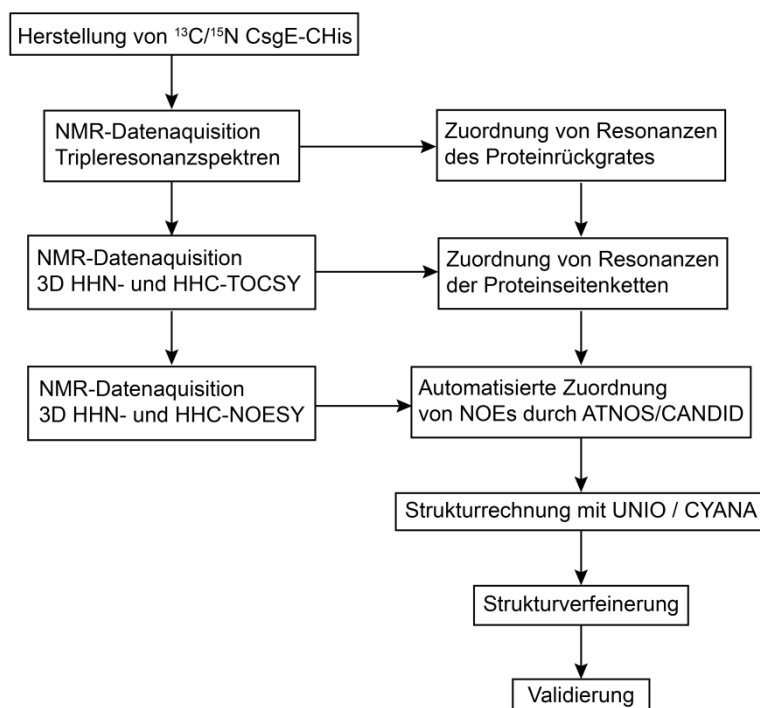


Abbildung 15: Strategie zur Lösungsstrukturaufklärung von CsgE-His₆ bei pH 3. Nach der Herstellung einer ¹³C/¹⁵N markierten CsgE-His₆ Probe bei pH 3 konnte ein vollständiger NMR-Datensatz (Tripleresonanzspektren, 3D-TOCSY- und 3D-NOESY-Spektren) aufgenommen werden. Nach der vollständigen Zuordnung aller Resonanzen wurde eine automatisierte Strukturrechnung mit UNIO'10 (Guerry & Herrmann 2012) durchgeführt, gefolgt von Verfeinerung und Validierung.

4.1.7 Resonanzzuordnung CsgE-His₆ Wildtyp

Die Zuordnung der Resonanzen wurde manuell mit dem Programm Cara (Keller 2004) durchgeführt. Durch die Verwendung von 2D ¹⁵N-HSQC und Tripleresonanzspektren des Typs HN(CO)CA, HNCA und HNCACB wurden die Resonanzen des Proteinerückgrates zugeordnet (siehe Abbildung 16 oben). Die sequenziellen Konnektivitäten zwischen Spinsystemen wurden durch die chemischen Verschiebungen von C α - und C β -Kernen hergestellt. Eine genauere Erklärung der Vorgehensweise findet sich in Abschnitt 3.8.9.

Die Korrektheit der Zuordnung wurde anhand eines 3D HHN-NOESYs überprüft. Da im NOESY Informationen über den Raum und nicht über kovalente Bindungen übertragen werden, zeigten benachbarte Aminosäuren ein typisches Muster gegenseitiger Korrelation (siehe Abbildung 16 unten). Die Amidprotonen eines Kerns (i) korrelierten jeweils mit den Kernen (i \pm 1) teilweise sogar mit (i \pm 2) oder auch (i \pm 3).

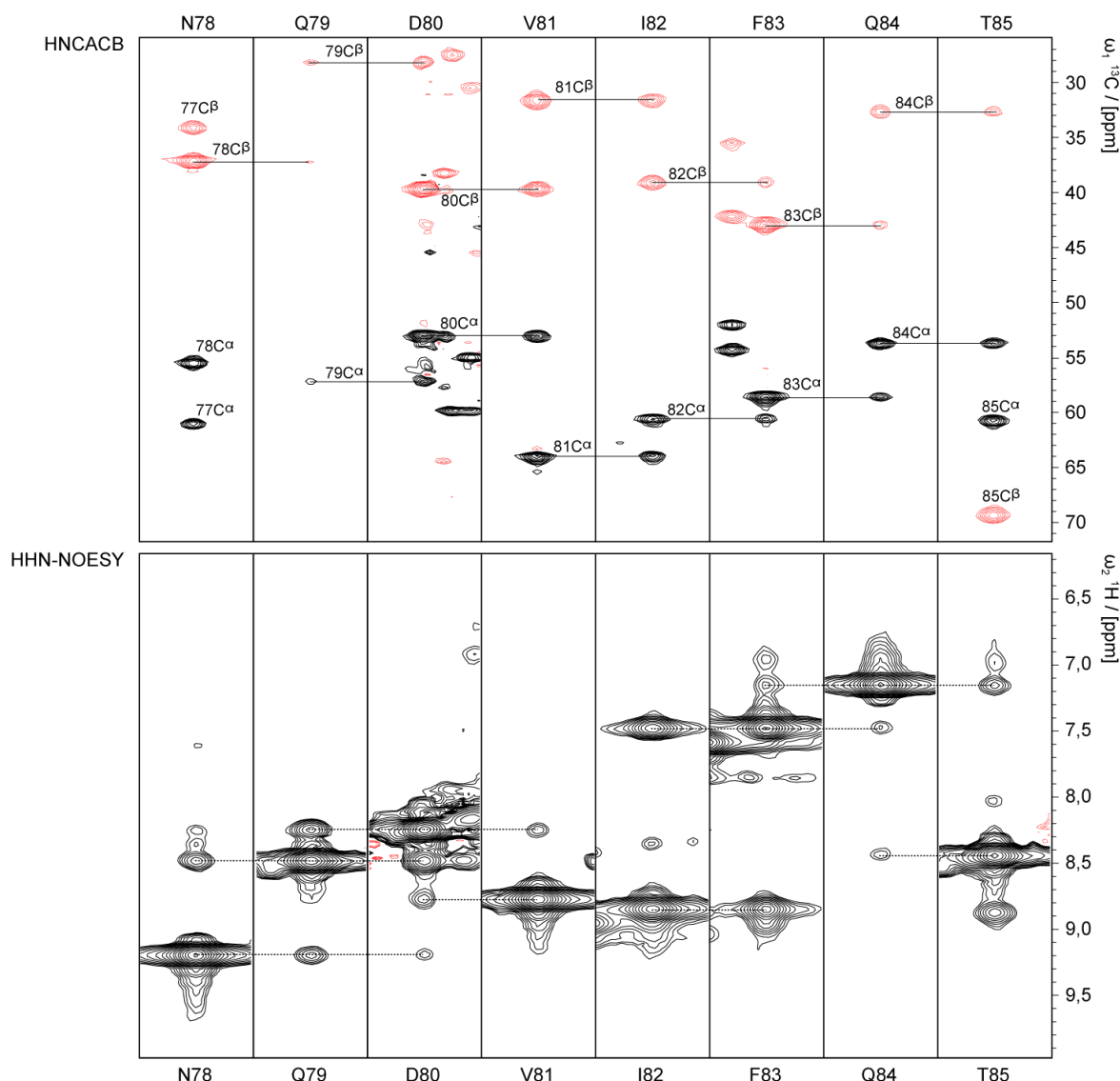
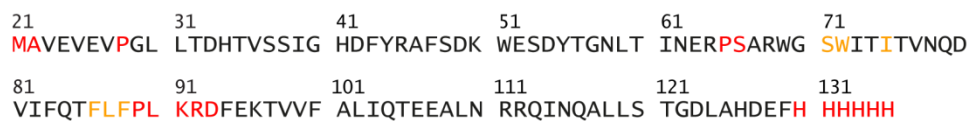


Abbildung 16: Zuordnung der Resonanzen des Proteinrückgrates CsgE-His₆ bei pH 3.

Oben: Auszug aus 3D HNCACB-Spektrum für den Sequenzabschnitt N78-T85. α in schwarz, β in rot. Dargestellt sind sequenzielle Konnektivitäten zwischen $\alpha_{(i)}$ und $\alpha_{(i-1)}$ bzw. $\beta_{(i)}$ und $\beta_{(i-1)}$. **Unten:** Auszug aus 3D-HHN-NOESY-Spektrum. Der Sequenzabschnitt zeigt das typische Resonanzmuster von benachbarten Amidprotonen.

Durch die hohe Qualität der NMR-Spektren konnten mehr als 86 % des Proteinrückgrates zugeordnet werden, wie in Abbildung 17 gezeigt wird. Die Resonanzen von His₆ konnten zwar identifiziert werden, wurden aber nicht sequenziell zugeordnet. Da dieser Bereich aller Wahrscheinlichkeit nach flexibel und nicht strukturiert war, wurde davon auch keine strukturelle Information erwartet.



Im Sequenzabschnitt S66-I75 wurden im Vergleich zu anderen Bereichen verbreiterte Spektrallinien beobachtet, was auf eine Dynamik dieses Bereichs hindeutete und Grund für die fehlende Zuordnung von S66 war. Ebenso verbreiterte Linien fanden sich im Abschnitt F86-F94, wobei die Reste L90-D93 gar nicht im HSQC-Spektrum abgebildet waren (vgl. Abbildung 17). Auch hier wurde eine dynamische Linienverbreiterung als Ursache vermutet.

unterschiedlicher Trägerfrequenzen, nicht gleichzeitig angeregt werden konnten. Der Bereich der Phenylalaninseitenketten im aromatischen ^{13}C -HSQC-Spektrum wies starke Überlappung der Resonanzen auf. Überraschend war außerdem, dass einige aromatische Seitenkettenprotonen, wie die von W69, W72, F86 und F88 nur sehr wenige NOE-Kontakte zur anderen Seitenkettenprotonen zeigten.

Insgesamt konnten die chemischen Verschiebungen von 80,7 % aller im Protein enthaltenen Atome zugeordnet werden. Für die Protonen lag die Vollständigkeit sogar bei 84,5 %. Dies wurde als ausreichend angesehen, um eine Strukturrechnung durchzuführen.

4.1.8 Lösungsstruktur von CsgE-His₆ bei pH 3

Grundvoraussetzung für die Strukturrechnung eines Proteins sind hochauflösende NOESY-Spektren und eine ausreichend vollständige Zuordnung der Resonanzen von Proton- und Heteroatomen im Protein.

Für die Berechnung der CsgE-His₆-Struktur wurden hochauflösende 3D-HHN-NOESY-, 3D HHC-NOESY-Spektren (separat für aliphatische und aromatische Aminosäuren) verwendet. Die Strukturrechnung (siehe auch Abschnitt 3.8.11) erfolgte vollautomatisch mit UNIO'10 (Guerry & Herrmann 2012) in Kombination mit Cyana (Güntert *et al.* 1997).

Während der Strukturrechnung wurden sieben iterative Zyklen aus NOE-Zuordnung und Molekulardynamik durchlaufen. Die Verfeinerung in Wasser erfolgte, wie in Abschnitt 3.8.12 beschrieben. Die Statistiken zur Strukturrechnung und Verfeinerung sind in Tabelle 21 aufgelistet. Es konnten insgesamt 1605 interproton NOE-Kontakte zugeordnet werden, was ca. 14 Kontakte pro Aminosäure entspricht. Davon waren ca. 25 % aller Kontakte von langer Reichweite, welche überwiegend den Kern des Proteins definieren. Dies wurde auch deutlich anhand der hohen Dichte an weitreichenden NOE-Kontakten im mittleren Sequenzabschnitt des Proteins (siehe Anhang Abbildung 45). Die beiden Termini wiesen dahingegen keine NOE-Kontakte von mittlerer oder langer Reichweite auf und stellten sich somit als unstrukturiert dar.

Durch die Strukturrechnung konnte das Monomer von CsgE-His₆ berechnet werden. Auch durch manuelle Überprüfung der NOESY-Daten konnten keine

Ergebnisse

intermolekularen Kontakte zugeordnet werden, was ebenfalls die Annahme eines monomerischen Zustands von CsgE-His₆ bei pH 3 stützte.

Tabelle 21: Strukturrechnungs- und Verfeinerungsstatistik für CsgE-His₆.

Parameter	Ergebnis	
	Strukturrechnung	nach Verfeinerung
NOE Distanzlimits gesamt	1605	
intraresiduell ($ i-j = 0$)	430 (26,8 %)	
sequenziell ($ i-j = 1$)	465 (29,0 %)	
mittlere Reichweite ($ i-j < 4$)	307 (19,1 %)	
lange Reichweite ($ i-j > 5$)	403 (25,1 %)	
Dihedrale Winkelbeziehungen	491	
Restwert der Zielfunktion (\AA^2)	$2,3 \pm 0,6$	
Restliche Verletzungen		
NOE $> 0,1 \text{ \AA}$		3 ± 2
Dihedrale Winkel $> 2,0^\circ$		3 ± 2
CNS-Energie (PARALLHDG-Kraftfeld) (kcal/mol)		
gesamt		$-4147,1 \pm 54,4$
van der Waals		$-506,2 \pm 17,2$
elektrostatisch		$-4462,0 \pm 58,7$
RMSD (\AA)		
Rückgrat (31-115) \AA		$0,87 \pm 0,15$
Schweratome (31-115) \AA		$1,43 \pm 0,20$
Ramachandran Statistik		
favorisiert %		74,8
erlaubt %		20,6
noch erlaubt %		1,7
nicht erlaubt %		2,9

Das Bündel aus den 20 energieärmsten Strukturen in Abbildung 18 zeigt, dass die Strukturrechnung konvergiert hat und die berechneten Einzelstrukturen eine hohe Ähnlichkeit besaßen (RMSD $0,87 \text{ \AA}$ vgl. Tabelle 21). N- und C-terminale Bereiche des Proteins waren flexibel und nicht strukturiert, wie aus den hohen RMSD-Werten (siehe Anhang Abbildung 46) abgeleitet werden kann. Das Protein zeigte ein $\beta\alpha\beta\beta\alpha$ -Faltungsmotiv bestehend aus zwei α -Helices und einem gemischten β -Faltblatt mit vier β -Strängen (siehe Abbildung 18 unten). Die fünf Schleifen S1

bis S5 wurden durch die NMR-Daten unterschiedlich gut abgebildet, wodurch S1, S2 und S4 eher geringe RMSD-Werte besaßen (siehe ebenfalls Abbildung 46 im Anhang). Für einige Reste aus S3 und S5 konnten keine oder nur wenige Resonanzen in den NMR-Daten zugeordnet werden, was zu hohen RMSD-Werten dieser Bereiche in der Struktur führte.

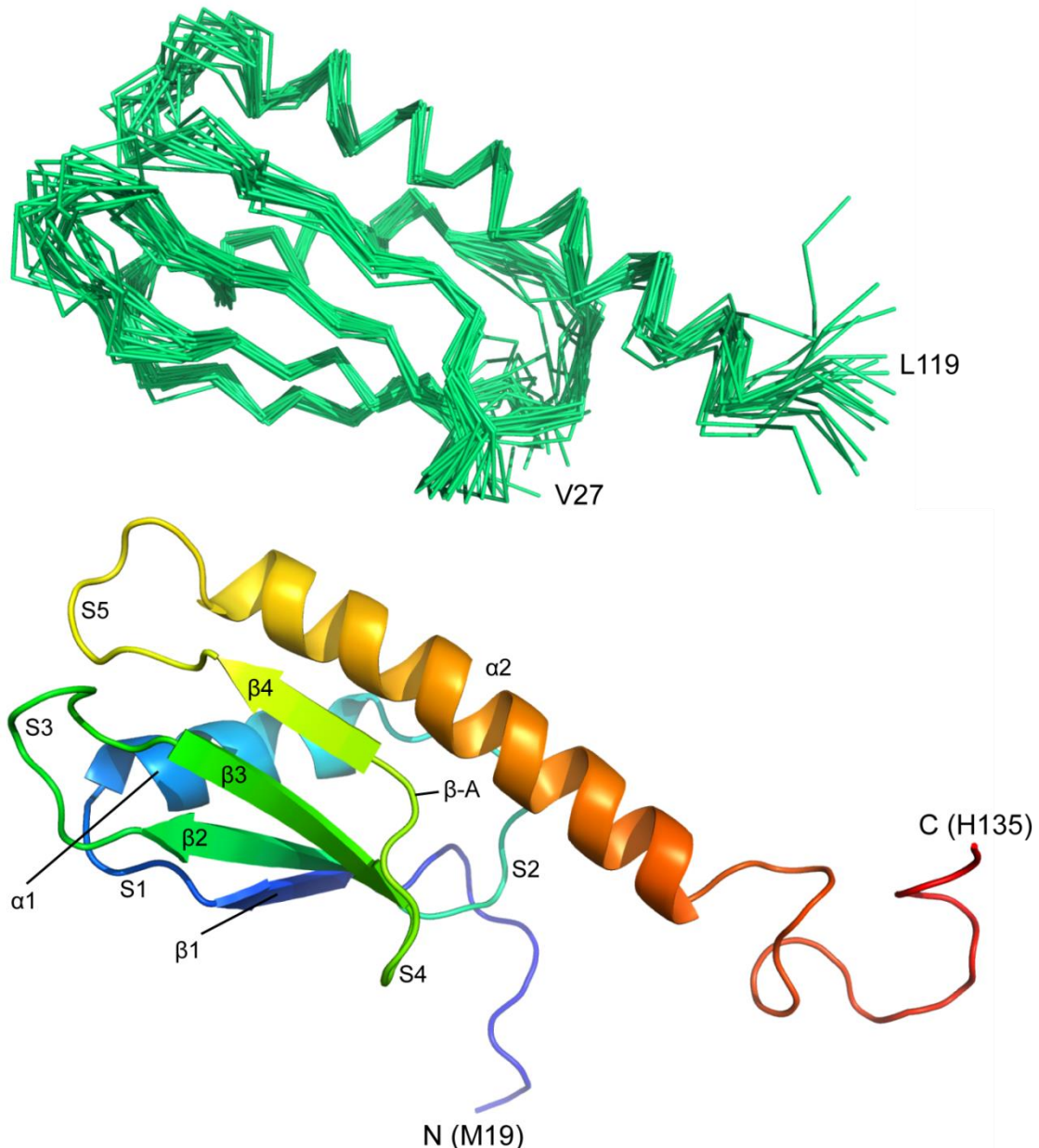
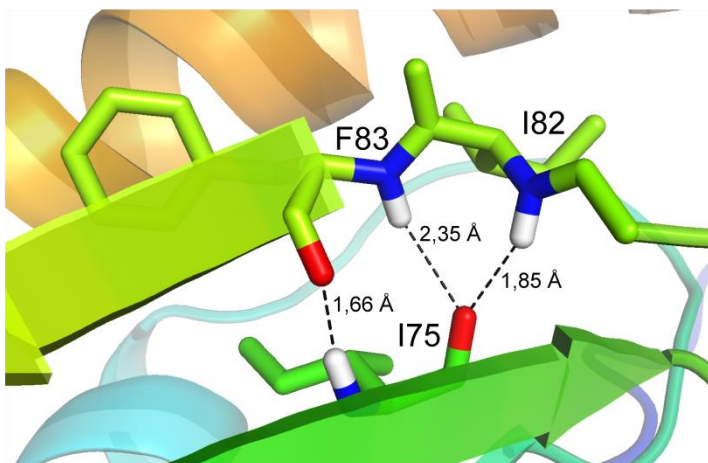


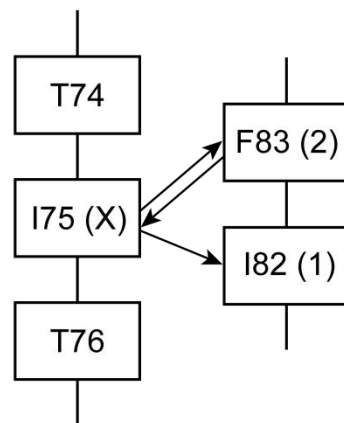
Abbildung 18: Lösungsstruktur von CsgE-His₆ bei pH 3. Oben: Proteinrückgrat von CsgE-His₆ als Bündel von 20 Strukturen mit niedrigster Energie nach der Strukturrechnung und Verfeinerung in Wasser. Die flexiblen Termini des Proteins sind nicht dargestellt. Unten: Bänderdarstellung von CsgE-His₆ (M19-H135). Das Protein besitzt zwei α-Helices (α), und ein gemischtes β-Faltblatt bestehend aus vier β-Strängen (β). Eine β-Ausstülpung (β-A) befindet sich zwischen Schleife (S) S4 und β4.

Zwischen S4 und $\beta 4$ befand sich eine sogenannte β -Ausstülpung (englisch: *β -bulge*). Diese wurde anhand des Strukturmodells näher charakterisiert und konnte als C(+)- β -Ausstülpung eingeordnet werden (Kabsch & Sander 1983). Dieser Bereich zeigte zwei Wasserstoffbrücken zwischen I75 und F83 und eine zwischen I75 (NH) und I82 (CO) (Abbildung 19 A und B), typisch für eine C(+)- β -Ausstülpung (Kabsch & Sander 1983; Chan *et al.* 1993). Außerdem charakteristisch waren die dihedralen Winkel aller drei beteiligten Reste (Abbildung 19 C), wobei I75 und F83 weiterhin Winkel eines β -Stranges besaßen, der ausgestülpte Rest I82 allerdings α -helikal war. Die β -Ausstülpung an I82 bewirkte, dass die Seitenketten von I82 und F83 zusammen in die gleiche Richtung wiesen und hydrophobe Kontakte zum mittleren Abschnitt von $\alpha 2$ bilden konnten.

A



B



C

	ϕ	ψ	Ramachandran
I75 (X)	$-87,8^\circ \pm 6,0^\circ$	$102,4^\circ \pm 6,6^\circ$	β -Strang
I82 (1)	$-100,5^\circ \pm 12,5^\circ$	$-61,4^\circ \pm 10,5^\circ$	α -Helix (rechtshändig)
F83 (2)	$-123,5^\circ \pm 16,8^\circ$	$117,8^\circ \pm 12,5^\circ$	β -Strang

Abbildung 19: Analyse der β -Ausstülpung. A: Darstellung der Wasserstoffbrücken zwischen $\beta 3$ und $\beta 4$ im Bereich der β -Ausstülpung. Sauerstoff in rot, Stickstoff in blau, Wasserstoff in weiß. B: Schematische Darstellung der Wasserstoffbrücken in der β -Ausstülpung. C: Analyse der dihedralen Winkel der beteiligten Aminosäuren in allen 20 Strukturen durch Molmol (Koradi *et al.* 1996). Region der Aminosäuren im Ramachandran-Diagramm. Der ausgestülpte Rest I82 besitzt α -helikale, dihedrale Winkel, charakteristisch für die Position (1) in einer β -Ausstülpung an. In Klammern die offizielle Nomenklatur für Reste in β -Ausstülpungen (Richardson *et al.* 1978).

Ein weiteres interessantes Merkmal der Struktur von CsgE war ein Cluster aus Aromaten auf der Oberfläche des Proteins. Abbildung 20 zeigt, dass die Seitenketten von W69, W72, F86 und F88 auf der Oberfläche des Proteins lagen und eine hydrophobe Fläche bildeten. Da sich die Reste W69 und F88 in den Schleifen S3 bzw. S5 befanden, war die Orientierung der dazugehörigen Seitenketten nicht exakt definiert. Trotzdem konnten einige sequentielle NOE-Kontakte für diese Reste in HHC-NOESYs zugeordnet werden, die zeigten, dass die genannten Tryptophan- und Phenylalaninreste nicht in den hydrophoben Kern des Proteins zeigen konnten. Deutlich wurde dies auch durch lange Seitenkettenkontakte zwischen W72 und R64 bzw. F86. Weitere Kontakte wurden zwischen den Seitenketten von S66/W69 in S3 und F88/P89 in S5 gefunden. Dieses Netzwerk aus gemessenen NOE-Kontakten war nur erklärbar durch eine Oberflächenexposition des aromatischen Clusters in CsgE.

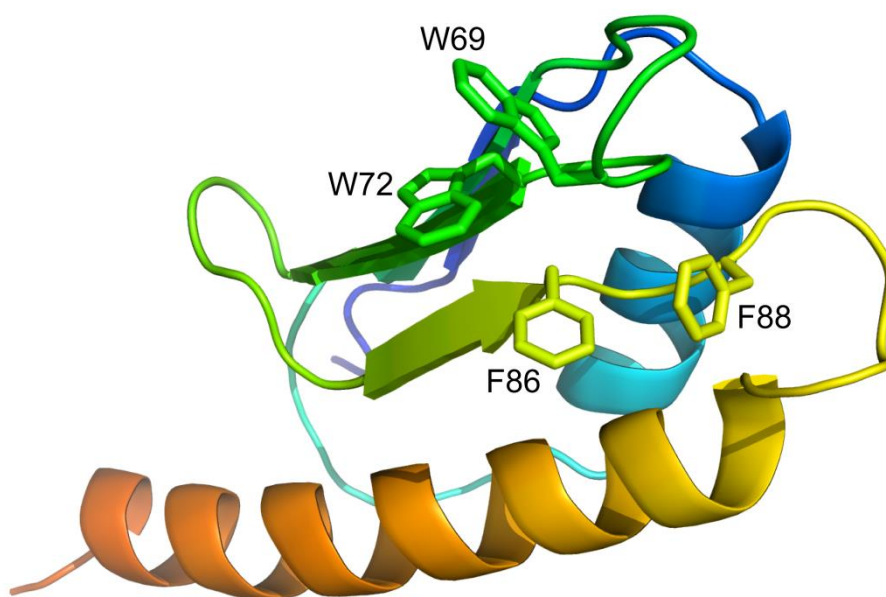


Abbildung 20: Cluster aus Aromaten auf der Oberfläche von CsgE-His₆. Bändermodell von CsgE-His₆. Zwei Tryptophanreste (W69 und W72) und zwei strukturell benachbarte Phenylalaninreste (F86 und F88) bilden ein aromatisches, oberflächenexponiertes Cluster.

4.2 Charakterisierung des Oligomerisierungszustands von CsgE-Oberflächenmutanten

Wie in den vorangegangenen Abschnitten gezeigt wurde, konnte die Lösungsstruktur von CsgE bei pH 3 aufgeklärt werden, da das Protein unter diesen Bedingungen als Monomer vorlag und eine hohe thermodynamische

Stabilität aufwies. Im physiologischen pH-Bereich von 6 bis 8, bildete CsgE *in vitro* Oligomere und tendierte zur Mikroaggregation bzw. Präzipitation, wie in den Abschnitten 4.1.3 und 4.1.5 schon erläutert wurde. Daraus ergab sich die Frage, ob die Selbstassoziation von CsgE physiologisch relevant ist und die Interaktion mit anderen Proteinen dadurch beeinflusst wird.

Um diese Fragestellungen klären zu können, wurde zunächst untersucht, welchen Einfluss Mutationen auf der Proteinoberfläche auf die Selbstassoziation des Proteins (Oligomerisierung) hatten. Basierend auf der Lösungsstruktur wurden insgesamt 18 Punktmutationen entworfen (siehe Abbildung 21), wobei einzelne negativ und positiv geladene Aminosäuren durch Alanin bzw. Serin ersetzt worden. Aromatische Aminosäuren wurden ebenfalls durch Serin ersetzt. Die Mutagenese wurde an CsgE-His₆ im pET11d-Vektor, wie in Abschnitt 3.3.3 beschrieben, durchgeführt. Durch eine anschließende Sequenzierung konnten die gewünschten Punktmutationen nachgewiesen werden, wobei F100 scheinbar zufällig zu Arginin mutiert wurde. Da aber auch die Mutation F100R eine maßgebliche Veränderung der Proteinoberfläche in diesem Bereich darstellt, wurde auf eine weitere Mutation zu Serin verzichtet.

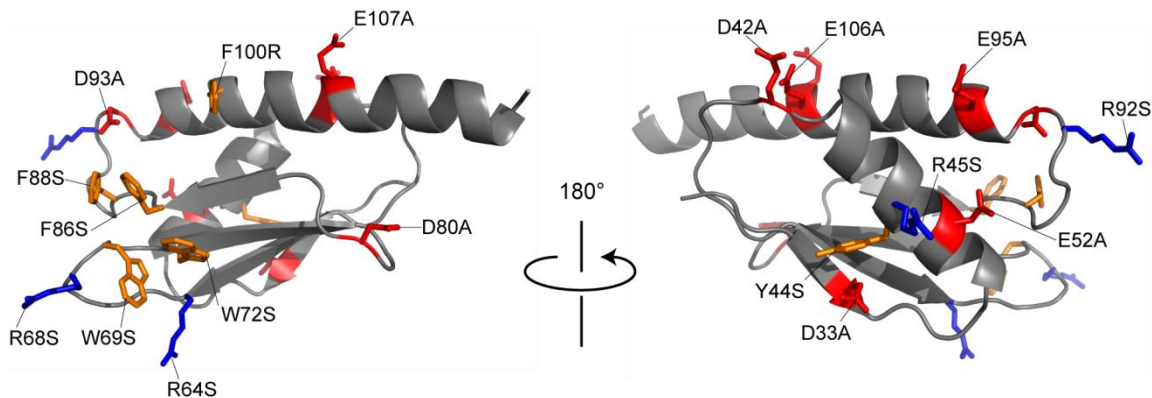


Abbildung 21: Positionen von Einzelmutationen auf der Oberfläche von CsgE-His₆. Positionen aller 18 einzeln mutierten Aminosäuren auf der Oberfläche von CsgE-His₆. saure Reste in rot, basische Reste in blau, aromatische Reste in orange.

Anschließend wurde versucht alle CsgE-His₆ Mutanten in *E. coli* überzuexprimieren und löslich analog zum Wildtyp zu reinigen. Das Ergebnis ist zusammenfassend in Tabelle 22 dargestellt. Nur zwei Punktmutanten CsgE W72S und CsgE F86S, welche Mutationen im aromatischen Cluster des Proteins besaßen, konnten nicht überexprimiert werden. CsgE D33A konnte zwar exprimiert, anschließend allerdings nicht löslich gereinigt werden. In allen drei Fällen bewirkten die Punktmutationen wahrscheinlich eine starke biochemische

Ergebnisse

Veränderung des Proteins, woraufhin es zum Abbau des Proteins (CsgE W72S und CsgE F86S) in *E. coli* bzw. zur Ablagerung als Einschlusskörperchen (CsgE D33A) kam.

Tabelle 22: Übersicht über die Eigenschaften der hergestellten CsgE Mutanten.

Punktmutation	Expression	Löslichkeit
CsgE D33A	gering	unlöslich
CsgE D42A	stark	löslich
CsgE Y44S	stark	wenig löslich
CsgE R45S	stark	löslich
CsgE E52A	mittel	löslich
CsgE R64S	stark	löslich
CsgE R68S	mittel	löslich
CsgE W69S	stark	löslich
CsgE W72S	keine	-
CsgE D80A	mittel	löslich
CsgE F86S	keine	-
CsgE F88S	stark	löslich
CsgE R92S	stark	löslich
CsgE D93A	gering	löslich
CsgE E95A	stark	löslich
CsgE F100R	stark	löslich
CsgE E106A	gering	löslich
CsgE E107A	stark	löslich

Zur Charakterisierung des Oligomerisierungsverhaltens der gereinigten CsgE Mutanten im Vergleich zum Wildtyp wurde der hydrodynamische Radius durch DLS gemessen und daraus das Molekulargewicht abgeschätzt. Das Ergebnis der Messung ist in Tabelle 23 zusammengefasst. Die meisten untersuchten CsgE-Mutanten zeigten einen ähnlichen Oligomerisierungszustand wie der Wildtyp, wobei der R_D größer als 4,3 nm und das Molekulargewicht größer 100 kDa war. Sechs Mutanten wiesen signifikant geringere R_D s auf, wobei R68S, E106A und E107A eine hohe Polydispersität ($> 15\%$) zeigten und somit wie auch der Wildtyp zur Mikroaggregation in Lösung neigten. Die Mutanten W69S, F88S und F100R wiesen deutlich geringere Partikelgrößen als die meisten der anderen Mutanten und als der Wildtyp auf und verhielten sich monodispers ($PD < 15\%$) in Lösung. Dies ließ die Schlussfolgerung zu, dass die Mutationen W69S und F88S im

Ergebnisse

aromatischen Cluster des Proteins eine Mikroaggregation des Proteins verhinderten. Auch F100R schien diese Selbstinteraktion des Proteins zu beeinflussen, da es sich auf der gleichen Seite des Proteins und in struktureller Nähe zum aromatischen Cluster befand, zu diesem aber immerhin einen Abstand von mindestens 10 Å besaß.

Tabelle 23: Bestimmung des hydrodynamischen Radius von CsgE Mutanten. Hydrodynamischer Radius R_D , Polydispersität PD, Molekulargewicht MG. Aufgeführt nur Partikeln kleiner 1000 kDa mit einem Massenanteil von mindestens 15 %. Gemessen bei 25 °C in 50 mM Tris pH 8, 250 mM NaCl. Proteinkonzentration jeweils mindestens 1 mg/ml.

Punktmutation	R_D in nm	PD in %	MG in kDa	Anteil in %
CsgE Wt	5,8	29,1	203	98,2
CsgE D42A	5,4	13,5	174	93,8
CsgE Y44S	5,5	20,1	183	94,0
CsgE R45S	5,5	43,4	181	99,4
CsgE E52A	4,4	8,6	109	70,0
CsgE R64S	4,7	16,4	126	93,9
CsgE R68S	4,0	69,8	86,8	95,6
CsgE W69S	3,3	13,7	56,5	78,9
CsgE D80A	4,6	12,1	122	81,9
CsgE F88S	3,7	12,2	72	98,6
CsgE R92S	5,1	38,4	152	96,4
CsgE D93A	5,0	12,4	145	92,3
CsgE E95A	5,5	12,3	183	93,6
CsgE F100R	4,0	6,9	85	40,0
CsgE E106A	2,7	134,6	35	88,2
CsgE E107A	1,7	22,6	12	48,4
	6,2	39,3	243	19,1

Um das Oligomerisierungsverhalten von CsgE-Mutanten genauer zu charakterisieren, wurden für einige der Mutanten 1D-Proton-NMR-Spektren gemessen und untereinander als auch mit dem Wildtyp verglichen. Anhand der Auflösung der NMR-Spektren konnte auf die Partikelgröße in Lösung geschlossen werden und gleichzeitig überprüft werden, ob eine NMR-Strukturaufklärung möglich war.

Die meisten der gemessenen 1D-Proton-Spektren von CsgE-Mutanten, die in Abbildung 22 dargestellt sind, zeigten ähnlich breite Spektrallinien und nur wenige spektrale Details, wie es für oligomeres Protein zu erwarten war. Zwei Ausnahmen bildeten die Mutanten W69S und F88S, welche vor allem im Bereich um 9 ppm gut

aufgelöste Resonanzen zeigten. Die geringere Linienbreite des 1D-Proton-Spektrum für CsgE W69S wies in diesem Fall auf einen monomeren Zustand des Proteins hin. CsgE F88S lag wahrscheinlich eher als Di- oder Trimer in Lösung vor, wie anhand des Spektrums abgeschätzt wurde. Dies korrelierte allerdings nur qualitativ, nicht aber quantitativ mit den DLS-Ergebnissen, wo für diese beiden CsgE Mutanten keine Monomere gemessen wurden. Vermutlich sind die unterschiedlichen Pufferbedingungen von NMR und DLS, dafür verantwortlich gewesen.

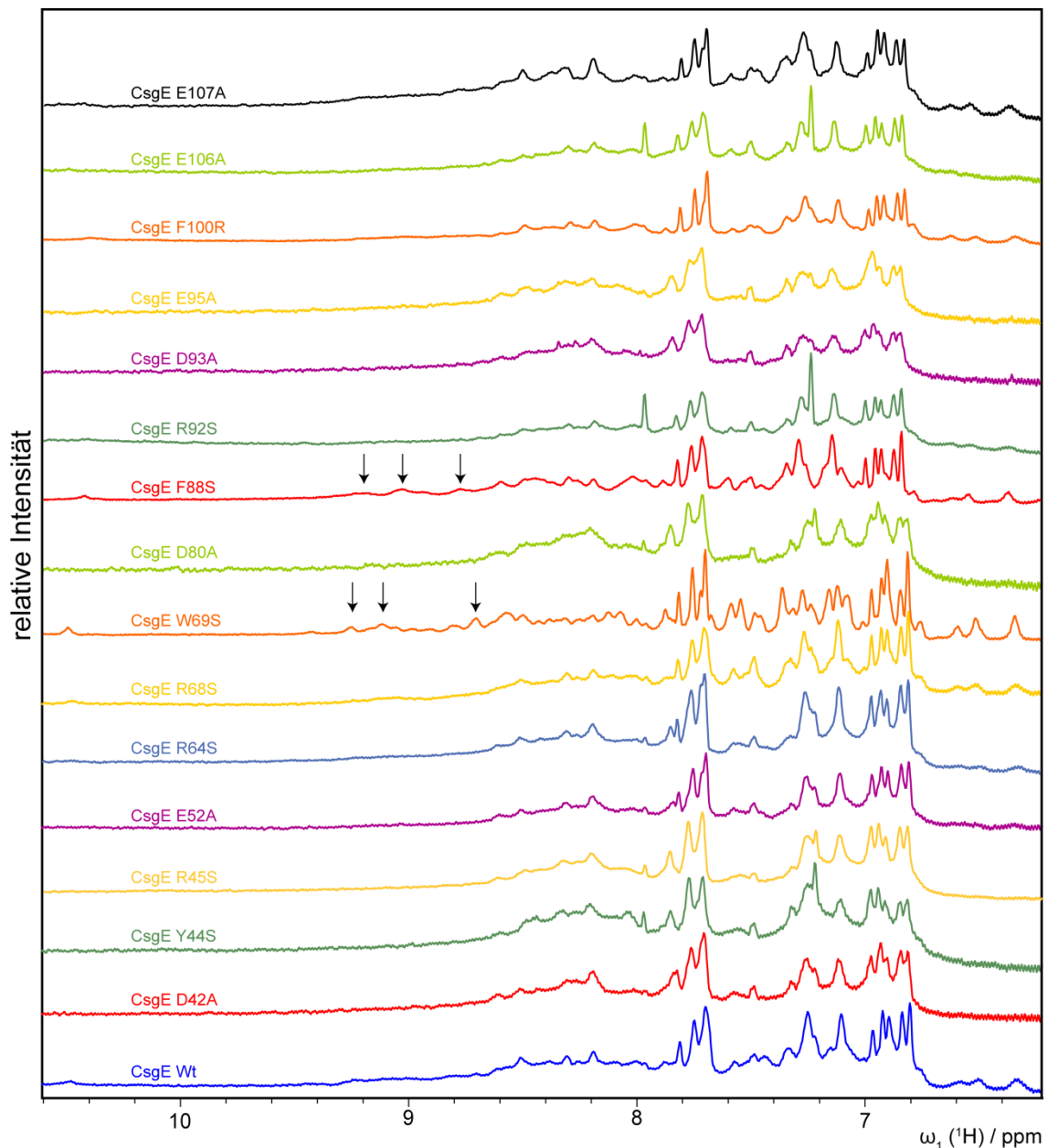


Abbildung 22: 1D NMR-Spektroskopie verschiedener Oberflächenmutanten von CsgE-His₆. 1D-Protonenspektren von 15 Oberflächenmutanten und des Wildtyps von CsgE-His₆ im Vergleich. CsgE W69S und CsgE F88S besitzen im Vergleich zum Wildtyp schmalere Linienbreiten und weisen deutlich mehr Details (Pfeile) im Spektrum auf, besonders im Bereich zwischen 8,0 und 9,4 ppm. Gemessen jeweils 140 μM Protein in 50 mM KPi pH 8 bei 25 °C.

Nach der Herstellung von ^{15}N CsgE W69S und ^{15}N CsgE F88S und der Aufnahme von 2D ^{15}N -HSQC-Spektren bestätigte sich die Annahme einer geringeren Selbstassoziation dieser CsgE-Varianten, wie im Anhang in Abbildung 47 dargestellt ist. Das ^{15}N -HSQC-Spektrum von ^{15}N CsgE W69S zeigte sehr homogene Spektrallinienbreiten und eine gute Resonanzseparation, wie es auch schon für CsgE Wildtyp als Monomer bei pH 3 der Fall war. Breitere, inhomogenere Spektrallinien für ^{15}N CsgE F88S deuteten hingegen auf selbstassoziiertes Protein hin, wobei diese Oligomerisierung von deutlich geringerem Ausmaß war als für CsgE Wildtyp.

Zusammenfassend konnte anhand der DLS- und NMR-Ergebnisse festgestellt werden, dass die Mutationen W69S und F88S im aromatischen Cluster von CsgE einen Einfluss auf das Oligomerisierungsverhalten des Proteins hatten. In beiden Fällen war im Vergleich zum Wildtyp eine Verringerung der Partikelgröße zu beobachten.

4.3 CsgE F88S zeigt hohe thermodynamische Stabilität *in vitro*

In einer Kooperation mit der Gruppe von Matthew Chapman konnte gezeigt werden, dass CsgE F88S nicht in der Lage war, die Curlbildung in einer ΔcsgE -Mutante von *E. coli* vollständig zu komplementieren, allerdings wurde CsgE F88S in höheren Mengen in den Zellen nachgewiesen, als CsgE Wildtyp (siehe dazu Diskussion Abschnitt 5.5). Auch CsgE W72S wurde in größeren Mengen *in vivo* nachgewiesen, konnte allerdings die Curlbildung vollständig komplementieren.

Die höheren Mengen an Protein könnten mit einer höheren Stabilität von CsgE W72S und CsgE F88S im Vergleich mit dem Wildtyp zusammenhängen. Daher wurde die thermodynamische Stabilität durch CD-Spektroskopie genauer untersucht. Es wurden CD-Schmelzkurven von CsgE Wildtyp, CsgE W69S und CsgE F88S (Durchführung siehe Abschnitt 3.5.6) aufgenommen, nicht aber von CsgE W72S, da diese Variante, wie im vorherigen Abschnitt erwähnt, nicht gereinigt werden konnte. Wie aus Abbildung 23 hervorgeht, wiesen CsgE W69S eine um 9,3 °C höhere und CsgE F88S eine um 18,8 °C höhere Schmelztemperatur auf als der Wildtyp des Proteins unter gleichen Bedingungen. Diese um fast 20 °C höhere Proteinstabilität gegenüber dem Wildtyp könnte ein

Grund für die nachweislich größeren Mengen des Proteins im Curlikomplementierungsexperiment sein. Die überraschende Steigerung der Proteinstabilität ließ aber auch die Frage aufkommen, inwieweit zusätzlich zur biochemischen Veränderung der Proteinoberfläche auch die Struktur des Proteins durch die Punktmutation verändert wurde.

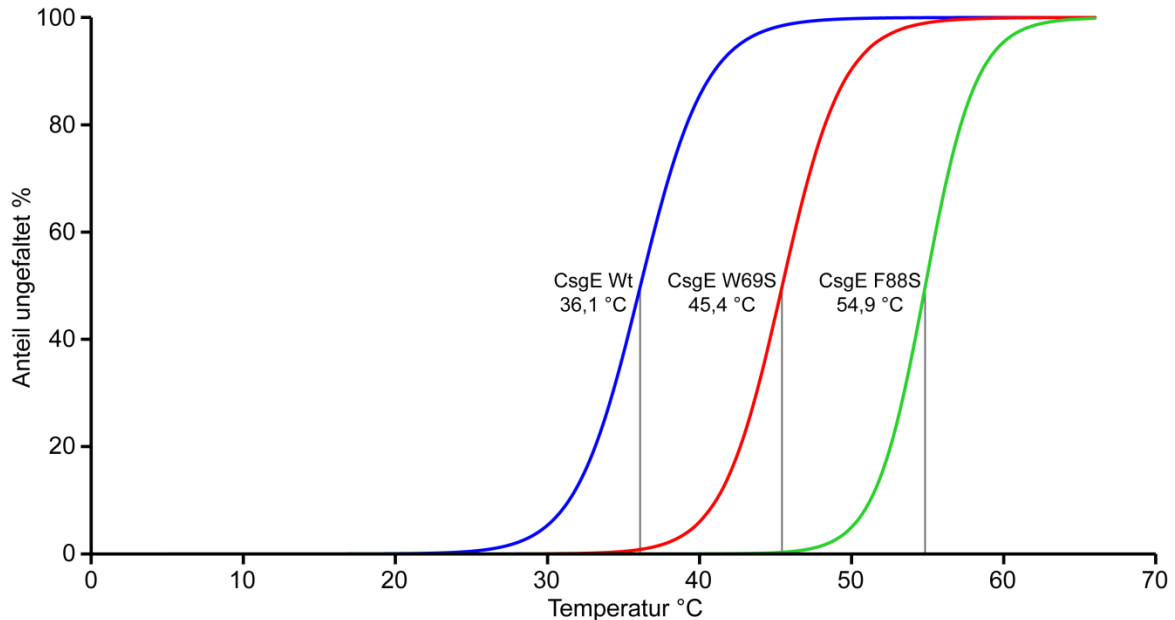


Abbildung 23: Schmelztemperatur von CsgE. Schmelzkurven von CsgE als Anteil ungefalteten Proteins gemessen mit CD-Spektroskopie bei 222 nm. CsgE Wt, CsgE W69S und CsgE F88S gemessen in 50 mM KPi pH 7,2 und 150 mM NaF, Schmelztemperatur bei 50 % ungefalteten Proteins.

4.4 Kristallstruktur von CsgE F88S

In den vorangegangenen Untersuchungen wurde festgestellt, dass CsgE F88S im Gegensatz zum Wildtyp des Proteins weniger stark in Lösung oligomerisiert und auch nicht die Curlbildung *in vivo* komplementieren kann. Es stellte sich heraus, dass CsgE F88S in höheren Mengen als der Wildtyp in *E. coli* nachweisbar war und dass dies mit der höheren thermodynamischen Stabilität des Proteins, um fast 20 °C höher im Vergleich zum Wildtyp, zusammenhängen konnte. Nun wurde geklärt, inwieweit die Mutation eine strukturelle Änderung im Protein hervorrief. Die inhomogenen NMR-Spektren ließen eine Strukturaufklärung von CsgE F88S durch Lösungs-NMR als unwahrscheinlich erscheinen, weshalb zunächst versucht CsgE F88S zu kristallisieren.

Um die Kristallstruktur von CsgE F88S aufzuklären, wurde ein Konstrukt geschaffen, das die Herstellung von CsgE F88S mit nahezu nativen Termini

Ergebnisse

zuließ. Dazu wurde CsgE Wildtyp in pGEX6p-Vektor kloniert, um ein Glutathion-S-Transferase-Fusionsprotein (GST) zu erzeugen. Anschließend wurde durch QuikChange-PCR die Mutation F88S generiert. Das Fusionsprotein konnte löslich in *E. coli* überexprimiert und anschließend durch Affinitätschromatographie an Glutathionagarose gereinigt werden. Im Anschluss wurde das Fusionsprotein proteolytisch mit PreScission-Protease gespalten, um danach GST und CsgE F88S über eine GFC trennen zu können (siehe Abbildung 24). Nach erfolgreicher Trennung wurden die proteinreichsten Fraktionen (Fraktionen 9-14) vereint und für die Kristallisation auf 27 mg/ml aufkonzentriert.

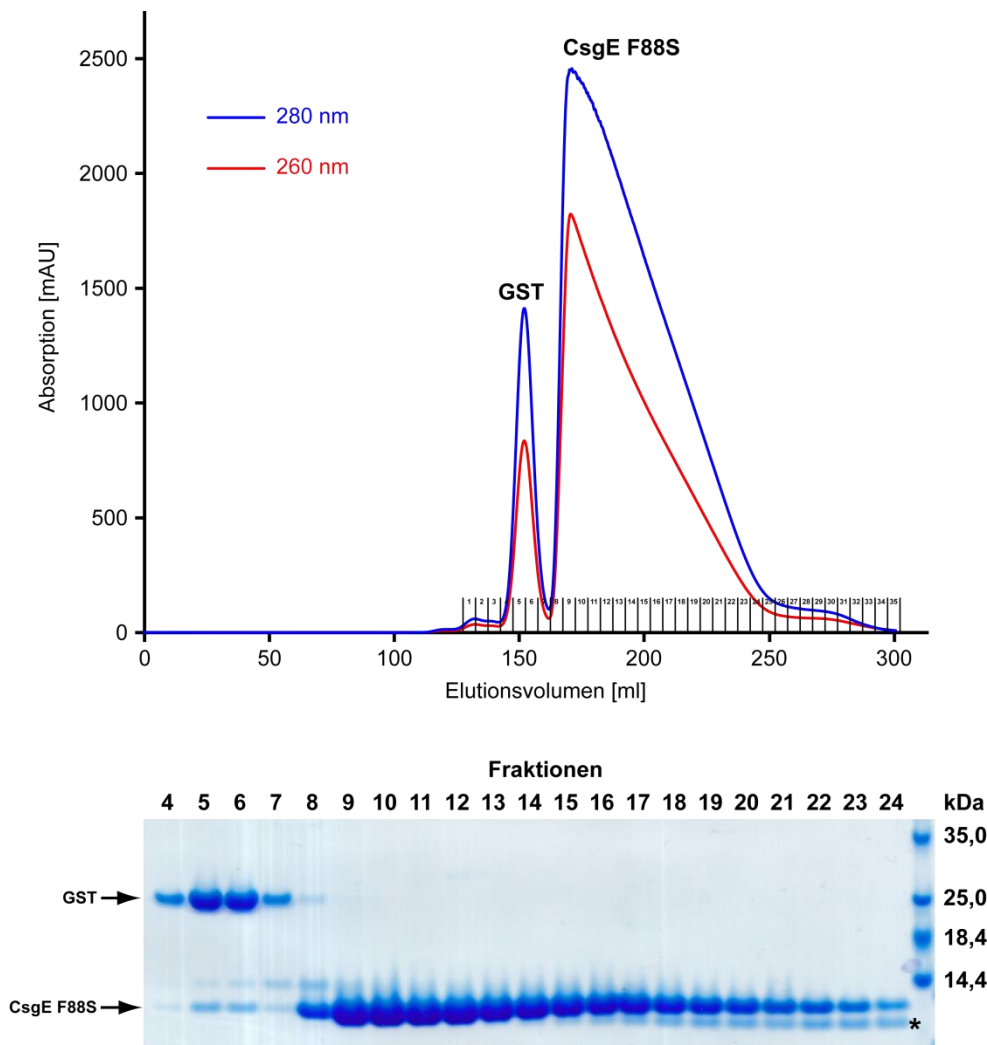


Abbildung 24: Reinigung von CsgE F88S. Oben: Gelfiltration von CsgE F88S nach Abspaltung von GST auf Superdex 75 26/60 in 20 mM Tris pH 8 und 150 mM NaCl. Unten: SDS-PAGE (Coomassie) Fraktionen der Gelfiltration. GST-Protein kann ausreichend gut abgetrennt werden. Fraktionen 9-14 für Kristallisation. Fraktionen mit proteolytischen Abbauprodukt (*) wurden verworfen.

Die Kristallisation von CsgE F88S ist in Abschnitt 3.9.2 beschrieben. Erste sehr dünne nadelförmige Kristalle bildeten sich nach drei Tagen unter diversen

Bedingungen, die alle organische Lösungsmittel (wie z. B. 1,2-Propandiol) als Präzipitant enthielten. Nach drei Wochen bildeten sich unter zwei weiteren Bedingungen jeweils zwei hexagonale Kristalle (siehe Abbildung 25 oben). Nur einer der beiden Kristalle lieferte Daten bis zu einer Auflösung von 2,6 Å an der hausinternen Röntgenquelle des HZI. Ein vollständiger Datensatz bis 2,1 Å wurde am DESY in Hamburg aufgenommen.

Der Datensatz wurde mit XDS (Kabsch 2010) in der monoklinen Raumgruppe C2 zu einer Auflösung von 2,1 Å prozessiert (siehe Tabelle 24). Nach Anisotropiekorrektur konnten Daten bis zu einer Auflösung von 2,0 Å verwendet werden, wobei die Vollständigkeit der Daten für die letzte Auflösungsschale unter 80 % fiel und daher die Auflösung der Struktur als 2,1 Å berichtet wird. Der Matthews-Koeffizient V_M wurde auf 2,37 Å³/Da bestimmt bei einem Solvensgehalt von 48,1 % und wies damit auf sechs Monomere in der asymmetrischen Einheit hin (Matthews 1968).

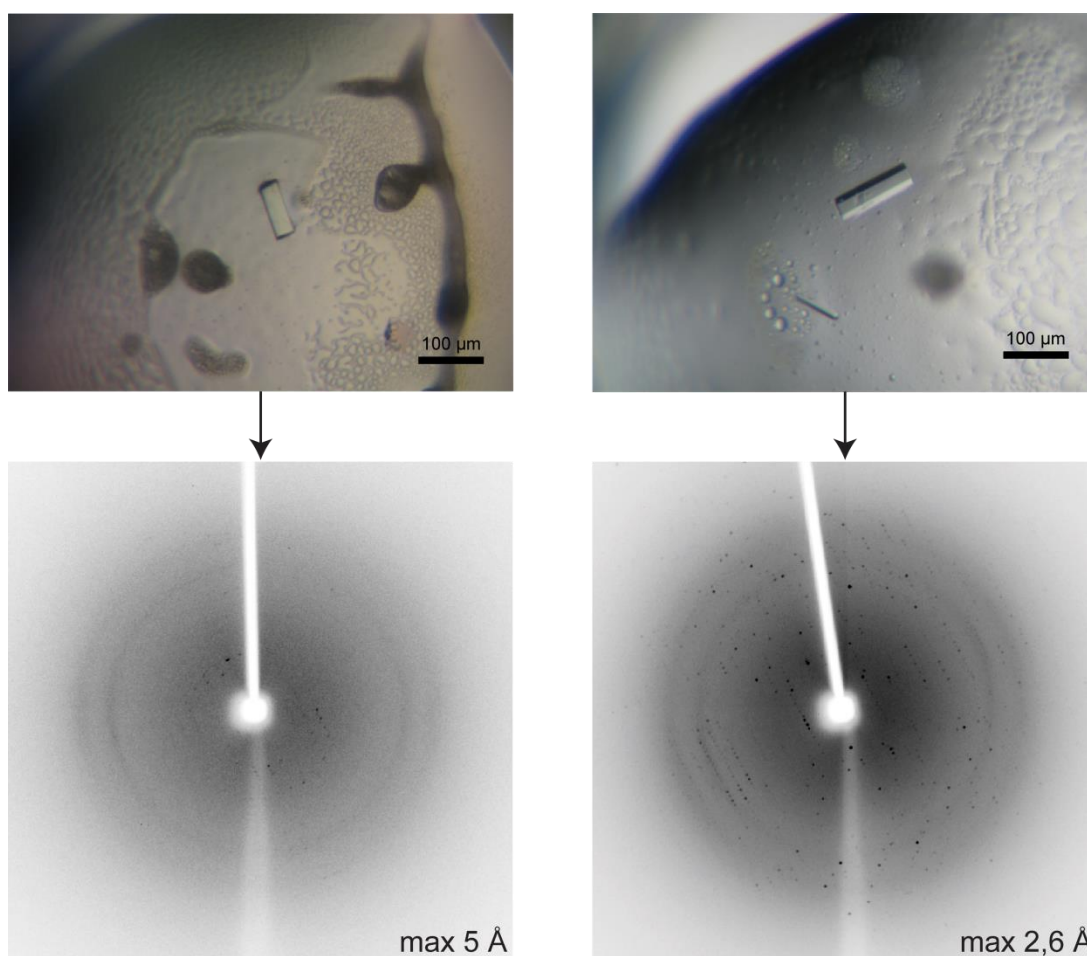


Abbildung 25: Kristalle von CsgE F68S. Links: Ein Kristall bei 0,1 M HEPES pH 7 und 20 % PEG 6000. Röntgenbeugung bis zu einer Auflösung von ca. 5 Å. Rechts: Zwei Kristalle bei 0,1 M MES pH 6,5 und 12 % PEG 20000. Röntgenbeugung bis zu einer Auflösung von 2,6 Å.

Das Phasenproblem konnte durch molekularen Ersatz gelöst werden, indem die NMR-Lösungsstruktur von CsgE bei pH 3 benutzt wurde (Details siehe Abschnitt 3.9.5). Im Suchmodell wurden die flexiblen Termini des Proteins und alle Schleifen entfernt, da deren Konformation in der NMR-Struktur nicht präzise dargestellt war. Außerdem wurden im Suchmodell alle Seitenketten außer Glycin und Alanin durch Serin ersetzt, wodurch das Proteinrückgrat und die Seitenketten bis zum C β -Atom gut wiedergegeben wurden.

Der MR durch Phenix.automr (Adams *et al.* 2010) konnte sechs Monomere von CsgE F88S in der asymmetrischen Einheit platzieren, wobei zwei von sechs Monomeren eine translationale Pseudosymmetrie aufwiesen. Nach dem MR betrug R_{krist} 40,5 % und R_{frei} 46,9%. Ein erster Verfeinerungsschritt reduzierte die R-Werte auf 30,0 % bzw. 34,0% und zeigte, dass die Lösung korrekt war.

Der Modellbau wurde manuell mit dem Programm COOT (Emsley *et al.* 2010) durchgeführt und iterativ mit PHENIX.refine (Adams *et al.* 2010) verfeinert. Die Werte zur Datensammlung und Verfeinerung sind in Tabelle 24 zusammengefasst. Die Werte für R_{krist} und R_{frei} konvergierten am Ende der Verfeinerung auf 17,2 % bzw. 22,5 %. Bindungslängen und -winkel zeigten nahezu ideale Geometrie bezogen auf die Engh & Huber Parameter und es existierten keine Ausreißer in der Ramachandranstatistik für die Struktur (Ramachandran & Sasisekharan 1968; Engh & Huber 1991).

Von den einzelnen Monomeren waren jeweils nur die Reste 30-116 durch die Elektronendichte abgebildet (siehe Abbildung 26 Teil A). Der N-Terminus (20-29) und der C-Terminus (117-129) des Proteins waren wahrscheinlich aufgrund von Flexibilität nicht in den Daten enthalten.

Ergebnisse

Tabelle 24: Datensammlung und Verfeinerungsstatistik zur Kristallstruktur von CsgE F88S.

Parameter	Ergebnis
<i>Datensammlung</i>	
Beamline	P11 beamline von PETRA III in Hamburg
Detektor	PILATUS 6M Pixel Detektor
Raumgruppe	C2
Elementarzellparameter (Å, °)	a=108,39; b=49,9; c=129,27; β =90,59
Wellenlänge (Å)	1,033
Auflösung (Å)	49,8-2,001 (2,05-2,00)
Mosaizität	0,4°
einzigartige Reflektionen	47355 (3415)
Vollständigkeit (%)	97,2 (67,2)
Redundanz	6,7 (4,7)
Signal zu Rauschverhältnis I/ σ I	12,0 (2,4)
R _{gesamt} (%)	12,0 (85,0)
Wilson B-Faktor (Å ²)	18,17
Solvensgehalt (%)	48,1
<i>Verfeinerungsstatistik</i>	
R _{krist} (%)	17,2 (22,8)
R _{frei} (%)	22,5 (28,31)
Anzahl Atome	4837
Protein	4325
Solvens	500
Liganden	12
Proteinreste	524
RMSD von ideale Geometrie	
Bindungslängen (Å)	0,005
Bindungswinkel (°)	0,85
Ramachandran Statistik	
favorisiert (%)	93,0
erlaubt (%)	6,0
noch erlaubt (%)	1,0
nicht erlaubt (%)	0,0
B-Faktor Durchschnitt	31,2
Protein (Å ²)	30,3
Solvens (Å ²)	39,5
Liganden (Å ²)	44,0

Werte in Klammern beziehen sich auf die Schale höchster Auflösung. R_{frei} Testdatenmenge war 5 %

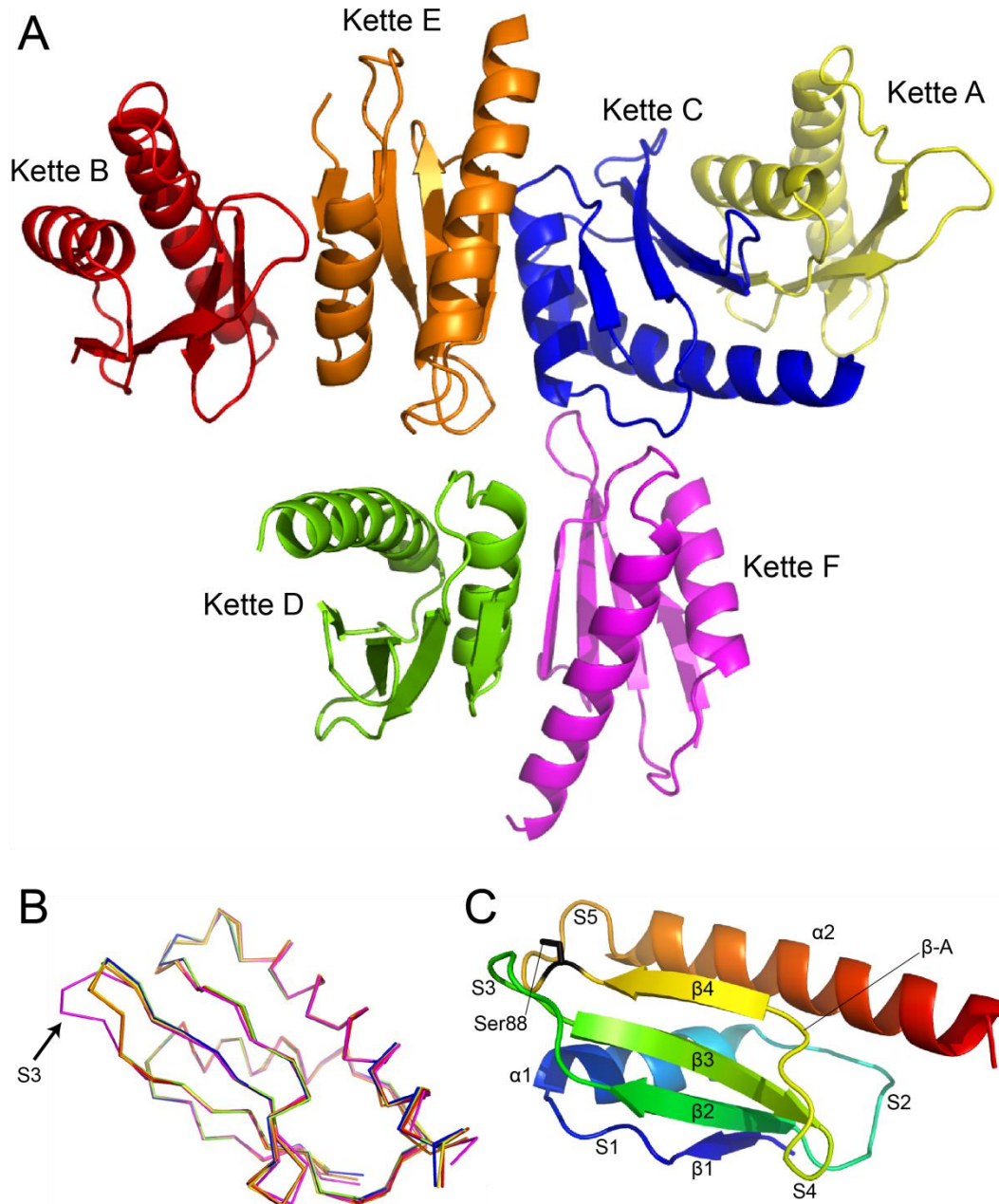


Abbildung 26: Kristallstruktur von CsgE F88S bei 2,1 Å. **A:** Sechs Monomere in der asymmetrischen Einheit als Ketten A-F. **B:** Überlagerung des Proteinrückgrates aller 6 Ketten der asymmetrischen Einheit, RMSD $0,5 \text{ Å} \pm 0,3 \text{ Å}$ berechnet mit molmol (Koradi *et al.* 1996). **C:** Bänderdiagramm von Kette A mit Position der Mutation F88S. Schleifen S1-S5, α-Helices: α1 und α2, β-Stränge: β1-β4, β-Ausstülpung: β-A.

Die Monomere von CsgE F88S bilden 17 verschiedene Kontaktflächen untereinander und zu symmetrieebenachbarten Monomeren aus, wie eine Analyse durch den *Protein Interfaces, Surfaces and Assemblies Service* (PISA) Server zeigte (Krissinel & Henrick 2007). Durch PISA konnte allerdings kein stabiler Komplex in Lösung errechnet werden, der auf ein Oligomer des Proteins hingewiesen hätte.

Die sechs Ketten des Proteins unterschieden sich kaum voneinander (RMSD $0,5 \text{ \AA} \pm 0,3 \text{ \AA}$), wie aus Abbildung 26 Teil B hervorgeht. Die Position von Schleife S3 in Kette F wich etwas in ihrer Lage von S3 in den anderen fünf Ketten ab und verdeutlichte die eigentliche Beweglichkeit dieses Bereichs, der im Kristall durch Protein-Protein-Kontakte fixiert war.

Die Kristallstruktur von CsgE F88S zeigte, wie schon die NMR-Struktur des Wildtyps, zwei α -Helices und ein gemischtes β -Faltblatt mit vier β -Strängen. Auch die schon beschriebene β -Ausstülpung war in der Struktur klar definiert. Eine Überlagerung der Kristallstruktur von CsgE F88S mit der NMR-Struktur des Wildtypproteins ergab eine mittlere Abweichung der C α -Kohlenstoffatome von $0,7 \text{ \AA}$ (siehe Abbildung 27). Dies zeigte, dass keine größeren Strukturveränderungen durch die Mutation F88S hervorgerufen wurden. Die Unterschiede in den Schleifen S2, S3 und S4 waren durch die vermutete Dynamik dieser Bereiche zu erklären.

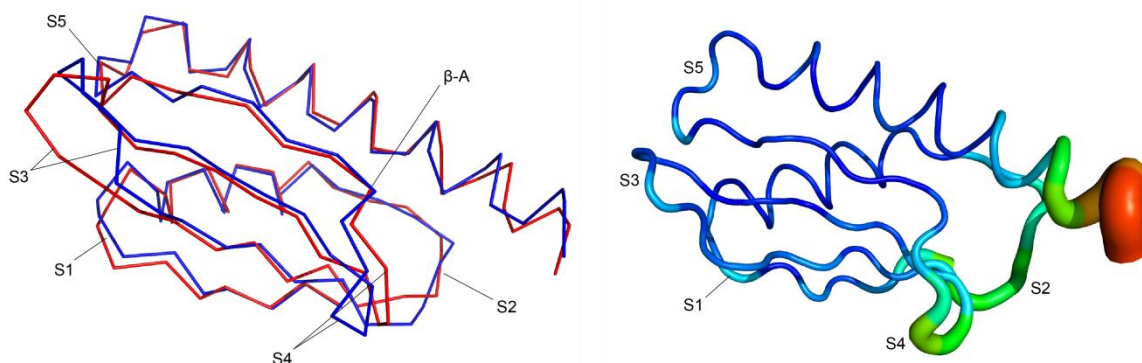


Abbildung 27: Vergleich Kristallstruktur CsgE F88S und NMR-Struktur CsgE-His₆. Links: Überlagerung der Kristallstruktur von CsgE F88S (blau) und der NMR-Struktur von CsgE-His₆ Wt bei pH 3 (rot). Rechts: Darstellung des Temperaturfaktors (B-Faktor) einzelner Reste in CsgE F88S als Wurstdarstellung (rot hoher B-Faktor).

Eine Analyse der Temperaturfaktoren (B-Faktoren) der Struktur von CsgE F88S in Abbildung 27 rechts zeigte, dass die Schleifen S2 und S4 eine höhere Beweglichkeit als der Rest des Proteins (abgesehen von N- und C-Terminus) aufwiesen. Im Vergleich zu den RMSD-Werten der NMR Struktur im Anhang in Abbildung 46 zeigten S3 und S5 im Kristall nur geringe Beweglichkeit.

Um zu analysieren, inwieweit die Mutation F88S lokal die Stabilität beeinflusste, wurde der Bereich der Schleife S5 und das gebildete Wasserstoffbrückennetzwerk in der Kristallstruktur untersucht (siehe Abbildung 28).

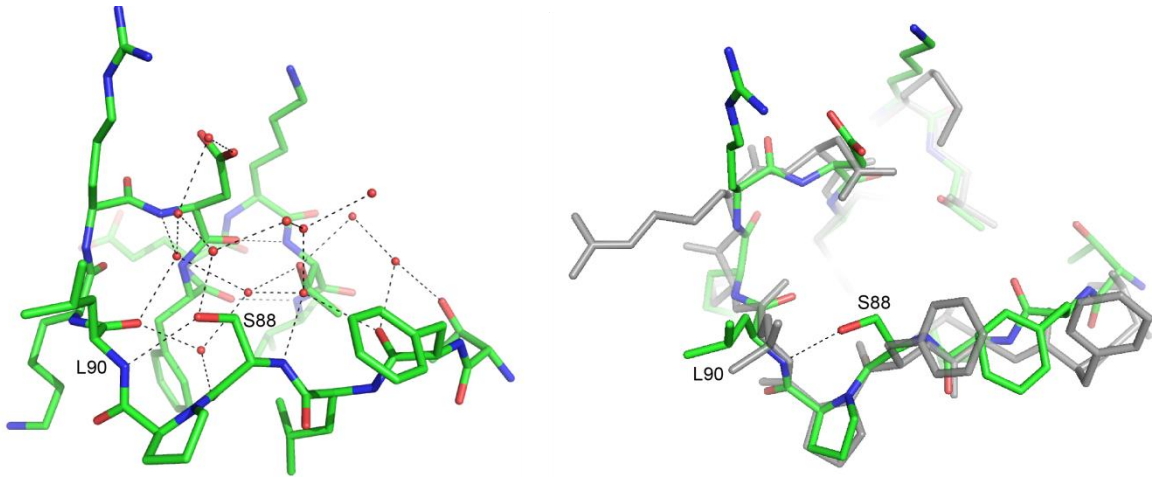


Abbildung 28: Wasserstoffbrückennetzwerk in S5 von CsgE F88S. Links: Netzwerk aus Wasserstoffbrücken (gestrichelte Linien) zwischen Protein und Wassermolekülen (rote Kugeln). Längen der dargestellten Wasserstoffbrücken zwischen 2,4 und 3,3 Å. Rechts: Überlagerung der Kristallstruktur von CsgE F88S (grün/rot/blau) und NMR-Struktur von CsgE-His₆ (grau). Stickstoff in blau, Sauerstoff in rot, Kohlenstoff in grün.

Es zeigte sich, dass durch das Einbringen der polaren Seitenkette von S88 eine neue Wasserstoffbrücke zum Amidproton von L90 gebildet werden konnte. Außerdem half die Hydroxygruppe von S88 mindestens ein Wassermolekül zu koordinieren. Dieses war über ein Netzwerk aus Wasserstoffbrücken mit weiteren Wassermolekülen und Proteinresten im Bereich der Schleife S5 verbunden.

Der Phenylring von F88 im Wildtyp ist nicht in der Lage ein solches Wasserstoffbrückennetzwerk auszubilden. Dies könnte hauptverantwortlich für den großen Schmelztemperaturunterschied zwischen den zwei Proteinvarianten sein. Die Position und Orientierung der Phenylalaninseitenkette von F88 in der NMR-Struktur (Abbildung 28 rechts) konnte durch die Strukturrechnung nicht exakt bestimmt werden, sodass nicht ausgeschlossen war, dass diese in das Innere der Schleife S5 zeigte und somit weniger Wassermoleküle koordiniert werden können als in der Struktur von CsgE F88S.

Diese Zusammenhänge erklären die Steigerung der thermodynamischen Stabilität von CsgE F88S, nicht aber der von CsgE W69S. Aus der Kristallstruktur war nicht ersichtlich, dass eine potentielle Mutation W69S neue Wasserstoffbrücken bilden könnte. Allerdings könnte sich die Schleife S3 durch die Mutation W69S reorientieren, sodass solche Kontakte ermöglicht werden. Dies war aber aus der Kristallstruktur nicht exakt vorhersagbar und blieb Spekulation.

4.5 *In vitro* Interaktionsstudien mit CsgE

Da die Struktur von CsgE gelöst werden konnte, stellte sich nun die Frage, inwieweit CsgE in Protein-Protein-Interaktionen eine Rolle spielt. In Abschnitt 1.6 wurde beschrieben, dass CsgE in eine Reihe von Proteinwechselwirkungen, z. B. mit CsgG und CsgA involviert sein könnte. Daher wurde untersucht, ob und inwieweit es möglich ist, eine Proteininteraktion zwischen CsgE und CsgA bzw. CsgG *in vitro* nachzuweisen und strukturell zu charakterisieren.

4.5.1 Charakterisierung der CsgE-CsgA Interaktion durch PRE

In einer Studie von Nenninger *et al.* wurde berichtet, dass CsgE die Autoaggregation von CsgA *in vitro* inhibierte. Die Autoren beschrieben dies als eventuell chaperon-ähnliche Funktion von CsgE (Nenninger *et al.* 2011).

Die Proteininteraktion zwischen CsgE und CsgA wurde in dieser Arbeit unter anderem *in vitro* mit Lösungs-NMR durch *paramagnetic relaxation enhancement* (PRE) genauer charakterisiert. In einem PRE-Experiment (siehe auch Abschnitt 3.7.3) werden paramagnetische Sonden, wie Moleküle mit freien Radikalen (z. B. MTSL), benutzt um qualitative Informationen über eine makromolekulare Interaktion zu sammeln. Die paramagnetische Sonde, gekoppelt an einen der Bindungspartner, bewirkt in ihrem Umfeld eine Relaxation von angeregten Kernspins, was zu einer spezifischen Linienverbreiterung (Signalintensitätsabnahme) der entsprechenden Resonanzen des zweiten Bindungspartners führt, wenn es zur Interaktion kommt.

Für die PRE-Experimente in dieser Arbeit wurde zum einen ^{15}N CsgE Wt bei pH 3 verwendet, da nur unter diesen Bedingungen hochauflösende 2D NMR-Spektren des Proteins erhalten werden konnten, und eine Resonanzzuordnung schon bestand. Zum anderen wurde CsgE W69S bei pH 6,5 verwendet, da dies eher als pH 3 physiologische Bedingungen darstellte und von CsgE W69S unter diesen Bedingungen eine Resonanzzuordnung möglich war. Als Interaktionspartner wurden Cystein-Punktmutanten von CsgA verwendet, an deren Thiolgruppe über Thioesterekopplung die paramagnetische Sonde MTSL angebracht werden konnte.

4.5.1.1 Interaktion von CsgE Wildtyp und CsgA bei pH 3

Die CsgA Cysteinvarianten N46C, S55C und N136C wurden, wie unter Abschnitt 3.4.4 beschrieben, exprimiert, gereinigt und anschließend mit MTSL gekoppelt (siehe Abschnitt 3.7.3). Die Proteine wurden im Verhältnis eins zu eins gemischt (jeweils 100 μ M) und direkt danach jeweils 2D-HSQC-Spektren gemessen. Als Referenzspektrum dienten 100 μ M CsgE allein ohne CsgA. Der Effekt der paramagnetischen Relaxation wurde als Abnahme der Signalintensität einzelner Resonanzen von Amidprotonen im Vergleich zum Referenzspektrum berechnet und ist in Abbildung 29 dargestellt. Für Asparagine, Glutamine und Tryptophane wurde der durchschnittliche Signalverlust der Resonanzen des Proteinerückgrates und der Seitenkette berechnet, wobei die Seitenkette doppelt gewichtet wurde, um die Oberflächenexposition stärker zu betonen.

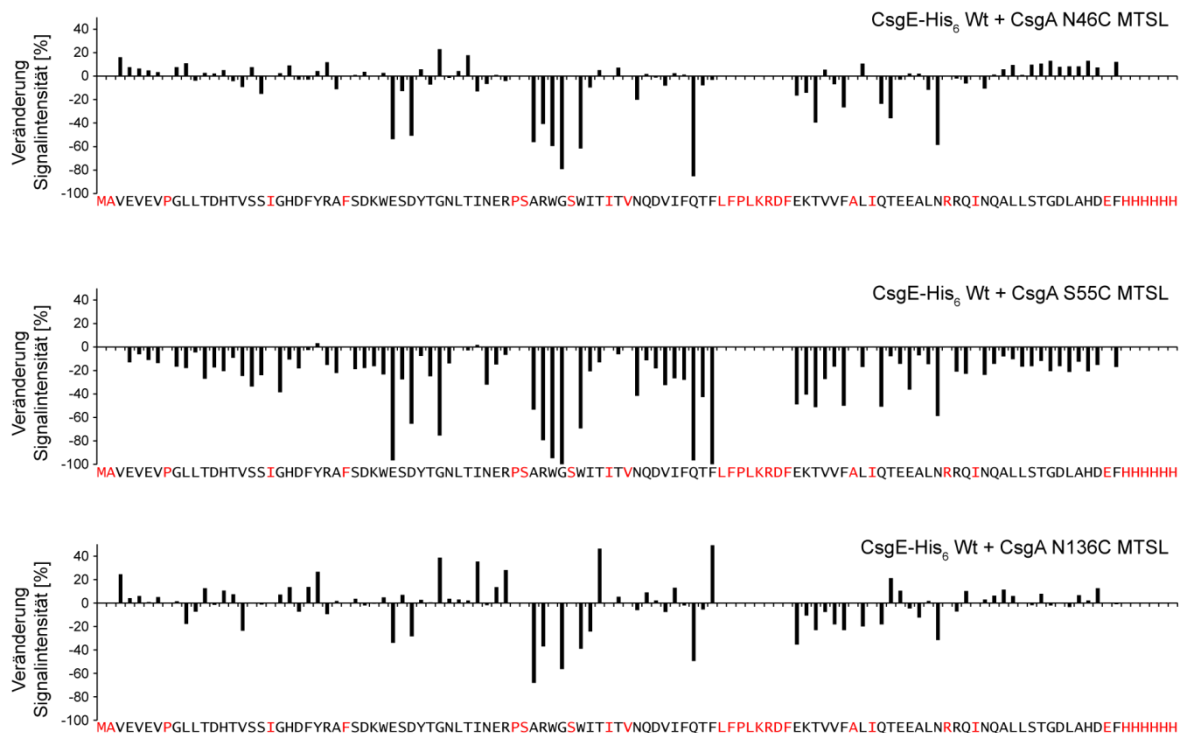


Abbildung 29: Analyse der PRE-Effekte von CsgA-MTSL auf CsgE Wt bei pH 3. Verlust an Signalintensität einzelner Reste von ¹⁵N CsgE Wt bei pH 3 (25 °C). CsgA N46C, CsgA S55C und CsgA N136C markiert mit der paramagnetische Sonde MTSL. Verhältnis CsgE/CsgA 1:1. Rotmarkierte Aminosäuren von CsgE Wt sind nicht analysierbar, da nicht zugeordnet oder starke Signalüberlappung. Für Asn, Gln und Trp: Durchschnittlicher Signalverlust aus Rückgrat- und Seitenkettenresonanzen, mit doppelter Gewichtung der Seitenkette.

Die Zugabe von CsgA N46C MTSL und CsgA S55C MTSL führte zu einem ähnlichen Muster relaxierter Resonanzen. Der CsgE Sequenzabschnitt von A67-W72 und die Reste E52, D54, Q84-F86, Q104, N110 wiesen in beiden Fällen eine

starke Abnahme der Intensität auf. Die Zugabe von CsgA N136C MTSL zeigte insgesamt einen schwächeren Relaxationseffekt als CsgA N46C MTSL und CsgA S55C MTSL. Trotzdem wiesen die Amidresonanzen von A67-W72 und Q84 einen deutlichen Verlust an Signalintensität auf.

Insgesamt wurden somit zwei mögliche Interaktionsflächen auf CsgE gefunden, welche im Anhang in Abbildung 49 auf der Oberfläche von CsgE dargestellt sind. Das Hauptepitop involviert die Schleife S3 und einige Reste in den Strängen $\beta 3$ und $\beta 4$. Ob die strukturell nahe Schleife S5 auch dazu gehört, konnte aufgrund der fehlenden Resonanzen dieses Bereichs nicht festgestellt werden. Das Nebenepitop auf der gegenüberliegenden Seite des Proteins beteiligt die Reste E52, D54 und N110. In einem Vergleich mit der elektrostatischen Oberfläche von CsgE (siehe Abbildung 49 D) zeigte sich, dass das Hauptepitop neben Resten des aromatischen Clusters auch einen Teil einer hydrophoben Furche auf CsgE beinhaltete, was auf eine hydrophobe Interaktion beider Proteine an dieser Stelle hindeutete. Das Nebenepitop umfasste unter anderem zwei saure Reste, die bei pH 3 möglicherweise protoniert vorlagen und damit den umgebenden Bereich hydrophober gestalteten, als bei höherem pH-Wert. Daher deutete das Nebenepitop auf unspezifische Wechselwirkungen hin.

Die Markierung von CsgA an drei unterschiedlichen Stellen (N46, S55 und N136) führte zu ähnlichen Interaktionsepitopen auf CsgE. Dies ließ die Schlussfolgerung zu, dass CsgE in der Lage ist spezifisch mit unterschiedlichen Abschnitten der repetitiven Sequenz von CsgA zu interagieren.

4.5.1.2 Interaktion von CsgE W69S und CsgA bei pH 6,5

Da die oben beschriebene Charakterisierung der Proteininteraktion zwischen CsgA und CsgE Wildtyp nur bei pH 3 durchgeführt werden konnte, stellte sich die Frage, inwieweit der niedrige pH-Wert die Proteinwechselwirkungen beeinflusst und ob es möglich ist vergleichbare Experimente auch bei physiologischem pH durchzuführen. Nachdem entdeckt wurde, dass CsgE W69S und CsgE F88S in Lösung weniger zur Selbstassoziation neigen, wurde aufgrund der in Abbildung 47 dargestellten HSQC-Spektren und der darin erkennbaren besseren Homogenität, CsgE W69S für die folgenden PRE-Experimente verwendet.

Für das Monomer von CsgE W69S in Lösung, wurde eine Zuordnung des Proteinerückgrates bei pH 6,5 angestrebt, was die Grundvoraussetzung für anschließende PRE-Experimente war.

Die Resonanzzuordnung des Proteinerückgrates von CsgE W69S bei pH 6,5 erfolgte auf analoge Weise zu CsgE Wildtyp bei pH 3 (siehe Abschnitt 3.8). Als Proteinkonzentration konnten maximal 300 μM eingesetzt werden, da höhere Konzentrationen zur Oligomerisierung des Proteins und damit zur deutlichen Qualitätsverschlechterung der NMR-Spektren führten. Zusätzlich waren mindestens 250 mM NaCl nötig, um eine Präzipitation des Proteins zu verhindern. Das 2D ^{15}N -HSQC-Spektrum von CsgE W69S mit zugeordneten Resonanzen ist im Anhang in Abbildung 48 dargestellt und zeigte, dass die meisten Resonanzen gut separiert waren und eine Auswertung der Signalintensitäten möglich wurde.

Die CsgA Punktmutanten N46C, S55C und N136C wurden wie zuvor gereinigt und mit der paramagnetischen Sonde MTSL markiert. Versuche, CsgA in den NMR-Puffer (50 mM KPi pH 6,5; 250 mM NaCl; 0,05% NaN₃) zu entsalzen, führten zur sofortigen Präzipitation des Proteins aufgrund der hohen Ionenstärke. Daher wurde zunächst in 50 mM KPi pH 6,5 entsalzt und anschließend 250 mM NaCl hinzugefügt. Durch die Vorversuche wurde außerdem deutlich, dass CsgA unter diesen Bedingungen in Konzentrationen von mehr als 30 μM sehr schnell aggregierte. Daher wurde für PRE-Experimente bei pH 6,5 ein CsgE W69S/CsgA-Verhältnis von 5:1 (100 μM ^{15}N CsgE W69S und 20 μM CsgA-MTSL) gewählt. Niedrigere Konzentrationen an ^{15}N CsgE W69S wurden ebenfalls ausprobiert, führten allerdings zu deutlich schlechteren 2D ^{15}N -HSQC-Spektren. Die Voruntersuchungen durch NMR zeigten außerdem, dass Mischungen aus ^{15}N CsgE W69S und CsgA, zu deutlich breiteren Spektrallinien im 2D ^{15}N -HSQC Spektrum führten als es für ^{15}N CsgE W69S allein der Fall war (Daten nicht gezeigt). Dies wies auf eine direkte Interaktion beider Proteine hin. Dabei traten allerdings keine signifikanten Veränderungen der chemischen Verschiebungen für CsgE W69S auf, was entweder auf eine schwache, transiente Interaktion oder eine Interaktion mit chemischem Austausch hinwies.

Die Probenvorbereitung ist in Abschnitt 3.7.3 beschrieben. Für die Mischungen aus ^{15}N CsgE W69S/CsgA-MTSL wurden zunächst 2D ^{15}N -HSQC-Spektren gemessen. Anschließend wurde der PRE-Effekt durch die Zugabe von

Ergebnisse

Ascorbinsäure im 20fachen Überschuss ausgelöscht und ein Referenzspektrum gemessen. Die Veränderung der Signalintensität wurde wie zuvor berechnet. Das Ergebnis des PRE-Experiments für ^{15}N CsgE W69S mit CsgA N46C, CsgA S55C bzw. CsgA N136C bei pH 6,5 ist in Abbildung 30 dargestellt. Eine negative Veränderung der Signalintensität wurde durch paramagnetische Relaxation hervorgerufen, eine positive Veränderung kam durch Proteinaggregation von ^{15}N CsgE W69S und damit verbundenen Ungenauigkeiten in der Signalintegration zustande. Diese Aggregation war für ^{15}N CsgE W69S ohne CsgA im gleichen Zeitraum nicht zu beobachten und war somit wahrscheinlich durch CsgA induziert. Die stärkste Abnahme der Signalintensität wurde durch CsgA N46C-MTSL ausgelöst und für die Bereiche H41-Y44, S66-I73 und I82-L87 auf ^{15}N CsgE W69S festgestellt. Die letzten beiden Bereiche zeigten ähnliches Verhalten mit CsgA S55C-MTSL. CsgA N136C-MTSL führte eher bei einzelnen Resten von ^{15}N CsgE W69S, wie A67 und L102, zur Abnahme der Signalintensität.

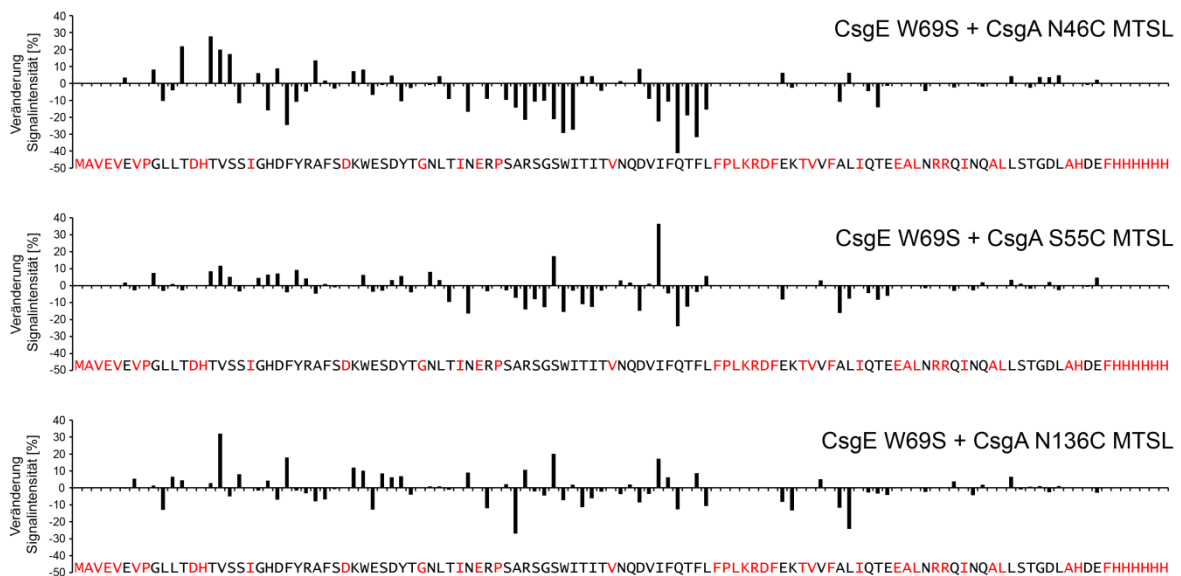


Abbildung 30: Analyse des PRE-Effekts von CsgA-MTSL auf ^{15}N CsgE W69S bei pH 6,5. Verlust an Signalintensität einzelner Reste von ^{15}N CsgE W69S bei pH 6,5 bei 18 °C. CsgA N46C, CsgA S55C und CsgA N136C markiert mit der paramagnetische Sonde MTSL. Verhältnis CsgE/CsgA 5:1. Rotmarkierte Aminosäuren von ^{15}N CsgE W69S sind nicht analysierbar, da entweder nicht zugeordnet oder starke Signalüberlappung vorlag. Für Asn, Gln und Trp: Durchschnittlicher Signalverlust aus Rückgrat- und Seitenkettenresonanzen, mit doppelter Gewichtung der Seitenkette.

Somit zeigte sich, dass, wie schon bei pH 3 für CsgE Wildtyp, auch bei pH 6,5 für CsgE W69S vor allem Reste in der Schleife S3 und in $\beta 3$ und $\beta 4$ in die Interaktion involviert waren. Dabei handelte es sich um das schon zuvor beschriebene Hauptepitop der Interaktion, wie auch in Abbildung 50 im Anhang gezeigt wird.

Die paramagnetischen Markierungen N46C-MTSL und S55C-MTSL in der ersten Sequenzwiederholung (R1) von CsgA hatten einen größeren Effekt als in R5 (N136C-MTSL), was auf eine Präferenz der Interaktion zwischen CsgE und CsgA an R1 hindeutet.

Nach mehreren Stunden wurden die Proben erneut vermessen und überraschenderweise festgestellt, dass die Signalintensitäten mit der Zeit abnahmen, allerdings ohne Positionsveränderung der Resonanzen. Dies konnte mit einer Mikroaggregation von CsgE erklärt werden, bei der das Protein NMR-spektroskopisch unsichtbar wurde. Ein ähnliches Verhalten war für CsgE W69S ohne CsgA unter gleichen Bedingungen erst nach mehreren Tage beobachtbar.

Um die CsgE/CsgA-Interaktion mit dieser Methodik nicht nur qualitativ sondern auch quantitativ zu untersuchen und die Bindungsstelle exakter zu charakterisieren, hätten Titrationsexperimente durchgeführt werden müssen. Dies war experimentell nicht möglich, da CsgE W69S durch Zugabe von CsgA scheinbar zur raschen Aggregation neigte und andererseits die Konzentration von CsgA nicht erhöht bzw. die von CsgE W69S nicht gesenkt werden konnte.

4.5.2 CsgE verändert die Autoaggregation von CsgA *in vitro*

Neben den NMR-Studien zur CsgE/CsgA-Interaktion wurde auch der Einfluss von CsgE auf die Autoaggregation von CsgA *in vitro* untersucht. Die Selbstaggregation von CsgA zu Amyloidfibrillen lässt sich durch den Fluoreszenzfarbstoff Thioflavin T (ThT) verfolgen, der nach Bindung an die Fibrillen eine Rotverschiebung seines Absorptions- und Emissionsmaximums erfährt. Mithilfe eines Fluoreszenzplattenlesers können parallel verschiedene Ansätze im Mikrotitermaßstab ausgelesen werden.

Neben CsgE Wildtyp wurde auch der Einfluss von CsgE W69S und CsgE F88S auf die Autoaggregation von CsgA untersucht. Jeder Ansatz enthielt 10 μM CsgA und entweder 5 μM , 10 μM oder 20 μM CsgE, sodass Verhältnisse von 1:0,5 und 1:1 und 1:2 entstanden. Als Pufferbedingung wurde 50 mM KPi pH 8, ohne NaCl gewählt, um eine salzinduzierte, rasche CsgA-Aggregation zu vermeiden. Außerdem war bei pH 8, im Gegensatz zu pH 6,5, auch CsgE Wildtyp löslich, und somit für dieses Experiment verwendbar. Es wurden jeweils vier analytische

Ergebnisse

Replikate gleichzeitig vermessen. Weitere Details zur Vorbereitung und Durchführung des Experimentes finden sich in Abschnitt 3.7.1.

Die zeitlichen Verläufe der ThT-Fluoreszenz sind in Abbildung 31 und Abbildung 32 dargestellt.

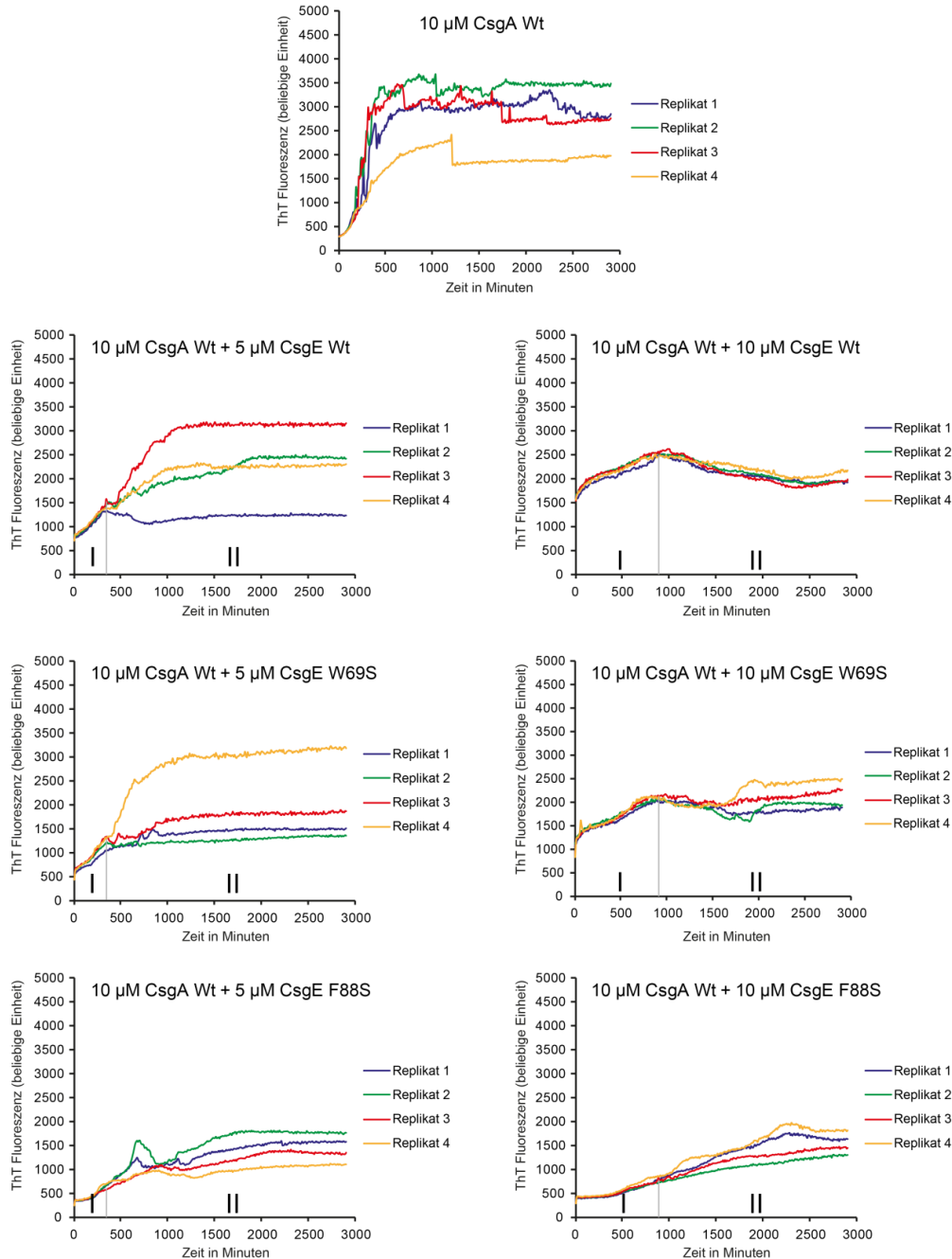


Abbildung 31: Aggregationsverhalten von CsgA in Gegenwart von CsgE Teil 1. Aufgetragen ist die ThT-Fluoreszenz über der Zeit für verschiedene Ansätze von CsgA in Gegenwart von CsgE Wt bzw. CsgE W69S oder CsgE F88S (Verhältnis 1:0,5 bzw. 1:1). Aus der Mischung der Proteine wurden vier identische Replikate hergestellt. Die Zeit zwischen Entsalzung von CsgA bis zum Start der Messung war ca. 40 Minuten. Puffer: 50 mM KPi pH 8, Temperatur 25 °C. „I“ und „II“: Phasen des Aggregationsverlaufs.

Wie erwartet zeigte CsgA allein nach kurzer Anlaufphase eine zeitliche, sigmoidale Veränderung des ThT-Signals bis nach ca. 1000 Minuten die Plateauphase erreicht war (vgl. Abbildung 31). Die erreichten Endintensitäten der Replikate unterschieden sich zum Teil.

CsgA/CsgE-Mischungen führten im Vergleich dazu zu deutlich anderen Fluoreszenzentwicklungen über die Zeit, welche sich in zwei Phasen I und II einteilen ließen (siehe Abbildung 31). In Phase I verhielten sich alle Replikate gleich und zeigten einen nahezu linearen Anstieg der Fluoreszenz und stabiles Verhalten. Der Übergang zu Phase II war abhängig von dem Mischungsverhältnis der beiden Proteine und lag bei ca. 350 bzw. 900 Minuten für das Verhältnis 1:0,5 bzw. 1:1. Phase II war charakterisiert durch einen scheinbar stochastischen Verlauf der Fluoreszenzintensität in den einzelnen Replikaten mit teilweisem Anstieg oder Abnahme der Intensität und unterschiedlichen Endintensitäten. Dies deutete darauf hin, dass unter diesen Bedingungen in Phase II, das *in vitro* System instabil war. Wenn CsgE im Unterschuss (1:0,5) vorlag, wurde nach maximal 2000 Minuten ein Intensitätsplateau erreicht, was bedeutete, dass der Aggregationsprozess in diesen Ansätzen beendet war. Die Fluoreszenz in äquimolaren Mischungen (1:1) aus CsgA und CsgE stieg bis zum Ende der Messung nach 2900 Minuten weiter an, was mit einem bis dahin anhaltenden Aggregationsprozess zu erklären war.

Das Auftreten von zwei Phasen im Aggregationsverlauf bedeutet, dass zwei unterschiedliche Prozesse stattfanden, die sich gegenseitig beeinflussten. In Phase I kam es vermutlich zur Interaktion zwischen freiem CsgE und CsgA, was die Polymerisation von CsgA verlangsamte, aber gleichzeitig zu einer ThT-detektierbaren Copräzipitation von CsgE und CsgA führte. Am Übergangspunkt zu Phase II war kein oder nur noch wenig CsgE in Lösung und die Polymerisation von CsgA konnte stattfinden, allerdings abhängig von der Menge löslichen CsgAs, restlichen CsgEs und entstandener Nukleationskeime. Dies würde auch erklären, warum eine unterschiedliche Stöchiometrie von CsgE zu CsgA den Zeitpunkt des Phasenübergangs verschob.

Ansätze mit einem Überschuss an CsgE Wildtyp bzw. CsgE W69S (siehe Abbildung 32) zeigten nach logarithmischem Anstieg ab 1500 bzw. 1000 Minuten keine Zunahme der Fluoreszenzintensität mehr. In beiden Fällen wiesen jeweils drei von vier Replikaten nahezu identische Verläufe auf. Interessanterweise war

Ergebnisse

die Endintensität der Fluoreszenz für CsgA/CsgE Wildtyp (1:2) deutlich höher als für CsgA allein (vgl. Abbildung 31). Dies bestätigte die Annahme, dass zusätzlich zu CsgA auch CsgE ThT-detektierbar aggregierte.

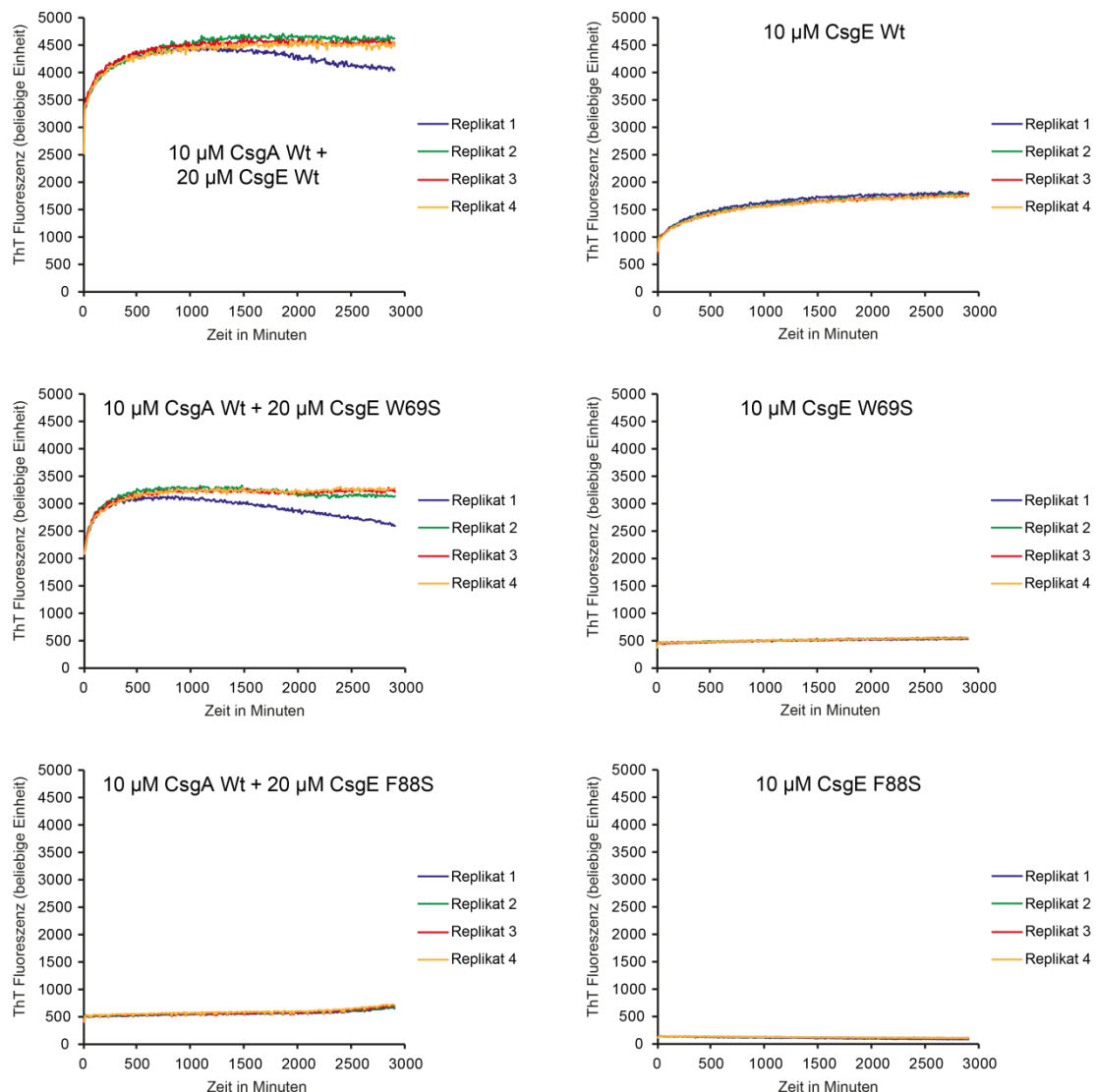


Abbildung 32: Aggregationsverhalten von CsgA in Gegenwart von CsgE Teil 2. Aufgetragen ist die ThT-Fluoreszenz über der Zeit für Ansätze von CsgA in Gegenwart von CsgE Wt bzw. CsgE W69S oder CsgE F88S (Verhältnis 1:2) und jeweils Kontrolle für CsgE Wt, CsgE W69S und CsgE F88S allein. Aus der Mischung der Proteine wurden vier identische Replikate hergestellt. Die Zeit zwischen Entsalzung von CsgA bis zum Start der Messung war ca. 40 Minuten. Puffer: 50 mM KPi pH 8, Temperatur 25 °C.

CsgE F88S im Überschuss (1:2) zeigte, im Gegensatz zu CsgE Wildtyp und CsgE W69S, keine ThT-detektierbare Aggregation und somit den stärksten inhibitorischen Effekt auf die CsgA-Autoaggregation, allerdings ohne selbst signifikant zu aggregieren. Möglicherweise war die deutlich höhere thermodynamische Stabilität von CsgE F88S (siehe Abschnitt 4.3) dafür verantwortlich. Eine Unterteilung in zwei Phasen war für Ansätze mit CsgE-

Überschuss für den Messzeitraum nicht zu beobachten, und wies damit ebenfalls auf den Einfluss der Stöchiometrie von CsgE zu CsgA auf die Aggregationskinetik hin.

Als Kontrolle in diesem Experiment wurde auch das ThT-Verhalten von CsgE allein untersucht (siehe Abbildung 32 rechts). Überraschenderweise wies CsgE Wildtyp allein einen zeitabhängigen Anstieg der ThT-Fluoreszenz auf, was eventuell auf Mikroaggregation von CsgE Wildtyp zurückzuführen war und ebenfalls eine Bestätigung darstellte, dass CsgE-Aggregate ThT binden konnten. Im Gegensatz dazu zeigten CsgE W69S und CsgE F88S keine signifikante Veränderung der Fluoreszenz, ein Zeichen für stabiles Verhalten dieser Varianten *in vitro*.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass CsgE die Autoaggregation von CsgA *in vitro* verändert, wobei überraschenderweise CsgA eine Aggregation von CsgE induziert. Die CsgA Aggregationskinetik hängt dabei deutlich von der Stöchiometrie beider Proteine ab und wird besonders stark von der Mutation F88S in CsgE beeinflusst. Möglicherweise steht dieser Effekt mit der erhöhten Proteinstabilität von CsgE F88S in Zusammenhang, wodurch die CsgA-induzierte Präzipitation von CsgE verlangsamt wurde.

4.5.3 CsgE coaggregiert mit CsgA *in vitro*

In vorangegangenen Experimenten zur Autoaggregation von CsgA wurde gezeigt, dass diese sich in Gegenwart von CsgE veränderte. Außerdem lieferten diese Experimente Hinweise, dass CsgE in Gegenwart von CsgA aggregierte. Daher wurde nun untersucht, ob es in CsgA/CsgE-Mischungen tatsächlich zur Coaggregation, also gleichzeitiger Präzipitation, beider Proteine kommt.

Die Coaggregation von CsgA mit CsgE Wildtyp, CsgE W69S und CsgE F88S wurde bei pH 8 und 25 °C untersucht (experimentelle Details siehe Abschnitt 3.7.4). Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden die löslichen Proteine im Überstand der Mischung und jeweils das SDS-lösliche bzw. Ameisensäurelösliche Proteinpräzipitat durch SDS-PAGE analysiert.

Das Ergebnis ist in Abbildung 33 dargestellt. CsgA aggregierte unter diesen Bedingungen in sechs bis acht Stunden, sodass kein lösliches CsgA-Protein mehr im Überstand nachzuweisen war. Dafür entstand ein Ameisensäurelösliches aber

Ergebnisse

nicht SDS-lösliches Präzipitat, ein Hinweis auf Amyloidbildung. In Gegenwart von CsgE Wildtyp oder den CsgE-Mutanten W69S und F88S war lösliches CsgA noch nach 8 Stunden im Überstand nachweisbar. Die CsgA-Präzipitation setzte in diesen Ansätzen deutlich später ein als für CsgA allein, führte allerdings auch zu ameisensäurelöslichem, SDS-unlöslichem Proteinaggregat.

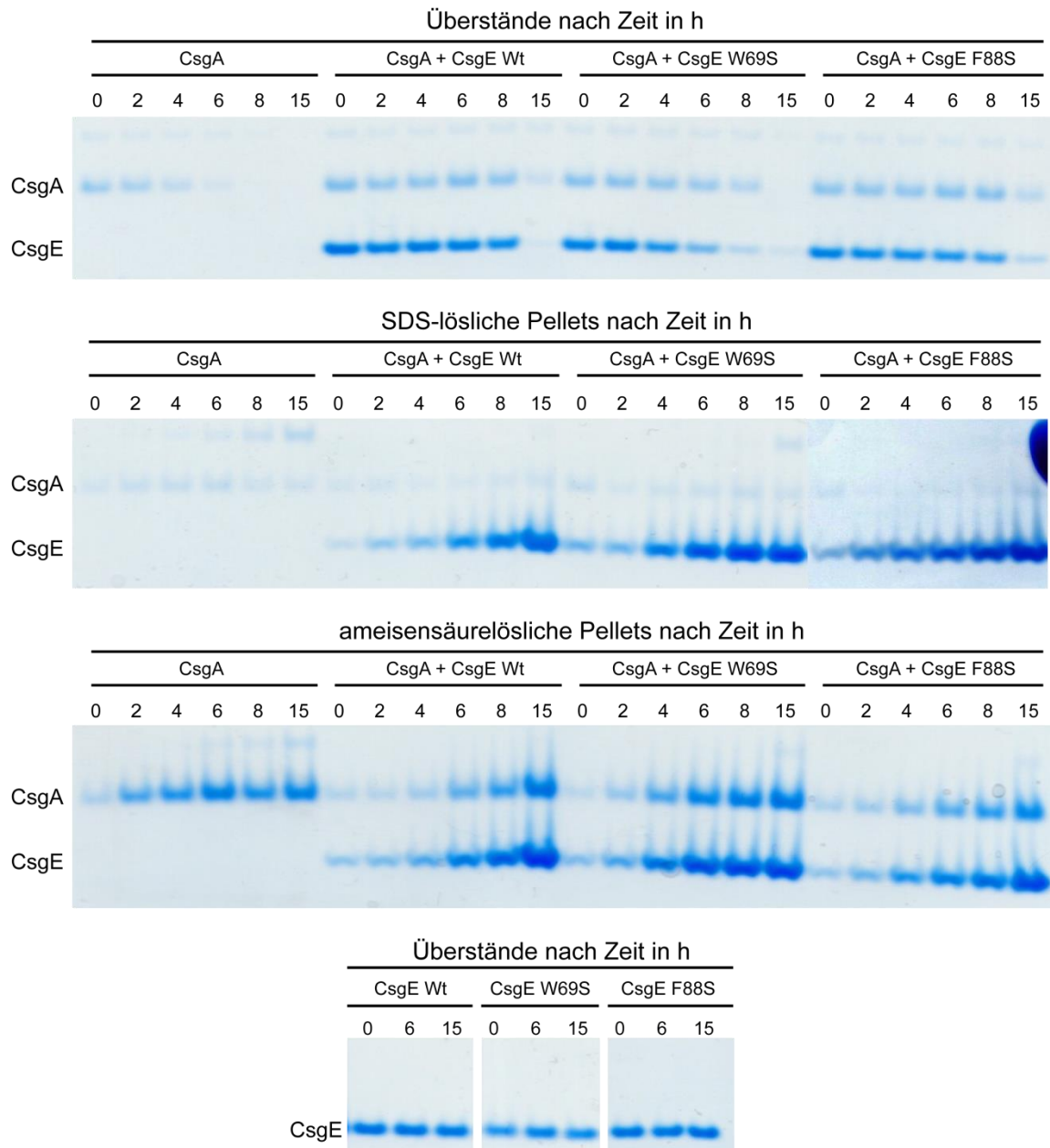


Abbildung 33: Coaggregation von CsgA und CsgE. SDS-PAGE-Gele (Coomassie gefärbt) von CsgA/CsgE Mischungen, jeweils Überstand, und präzipitierte Proteine in Form von SDS-löslichen Pellet und ameisensäurelöslichen Pellet. Jeweils 10 μ M CsgA bzw. 10 μ M CsgE-Variante. Probennahme erfolgte zu Beginn und nach 2, 4, 6, 8 bzw. 15 Stunden.

Nach 15 Stunden war CsgA auch in Gegenwart von CsgE fast vollständig präzipitiert. Überraschenderweise aggregierte in Gegenwart von CsgA auch CsgE

mit der Zeit, sodass es nach 15 Stunden nicht oder nur kaum noch löslich nachweisbar war. Anders als CsgA bildete CsgE ein SDS-lösliches Proteinaggregat. Die Mengen an präzipitierten CsgA korrelierten mit den Mengen an präzipitierten CsgE in den Pellets, sodass dies hier als Coaggregation beschrieben wird. In Kontrollen blieb CsgE löslich im Überstand. Es zeigten sich auch leichte zeitliche Unterschiede in der Coaggregation zwischen den einzelnen verwendeten Varianten von CsgE. CsgA Mischungen mit CsgE Wildtyp und CsgE F88S coaggregierten deutlich langsamer als CsgA/CsgEW69S, wie aus der Bandenstärke abzulesen war.

Durch die Analyse der Coaggregation von CsgA und CsgE *in vitro* konnte letztendlich gezeigt werden, dass CsgE die Präzipitation von CsgA verlangsamt, allerdings selbst ebenfalls präzipitiert. Dies bestätigt zwar die Beobachtungen im ThT-Assay und den PRE-Experimenten, wirft aber die Frage auf, nach der Übertragbarkeit dieser Erkenntnisse auf das Geschehen *in vivo* (siehe Diskussion Abschnitt 5.4).

4.6 Die Bindung von CsgE an CsgG

In Zusammenarbeit mit der Gruppe von Matthew Chapman konnte gezeigt werden, dass die Punktmutationen W69S und W72S, nicht aber F88S in CsgE, die Curlbildung *in vivo* komplementieren konnten (siehe Diskussion Abschnitt 5.5). Die anschließend durchgeführten Interaktionsstudien zwischen CsgA und CsgE *in vitro* zeigten eine Wechselwirkung beider Proteine, wobei sie coaggregierten.

Neben der Interaktion mit Substratproteinen des CsgG-abhängigen Transports, wie z. B. CsgA, könnte auch die Bindung zwischen CsgE und CsgG durch die Punktmutation F88S beeinträchtigt gewesen sein. Daher wurden im Folgenden Bindungsstudien zwischen CsgG und CsgE Wildtyp und CsgE-Varianten durchgeführt, darunter auch CsgE W69S und CsgE F88S.

Die Bindung von CsgG an CsgE wurde per Pulldown untersucht, wobei CsgG-His₆ per anti-His₆-Antikörper im Westernblot nachgewiesen wurde. CsgE-Wildtyp wurde in pGEX6p-Vektor kloniert, um ein GST-Fusionsprotein zu erzeugen. Basierend darauf wurden die Punktmutationen Y44S, R45S, E52A, R64S, R68S, W69S, W72S, F86S, F88S, R92S und F100S, vgl. Abschnitt 4.2 eingefügt. Die GST-CsgE-Fusionsproteine wurden löslich exprimiert und gereinigt (siehe Abschnitt

3.4.5). Anschließend wurden sie per GFC nachgereinigt, wobei allerdings die bei der Expression gebildeten Translationsabbruchprodukte (20-30 kDa) nicht abgetrennt werden konnten.

Im Pulldownexperiment wurden GST-CsgE-Fusionsproteine an Glutathionagarose immobilisiert und anschließend CsgG-His₆ direkt aus CsgG-His₆-Solubilisat daran gebunden (für experimentelle Details siehe Abschnitt 3.7.2). Als Negativkontrollen dienten unbeladene Glutathionagarose und immobilisiertes GST-Protein. Die Mengen an eluierten Proteinen wurden mit SDS-PAGE und Westernblot analysiert.

Abbildung 34 zeigt, dass jeweils vergleichbare Mengen von GST-CsgE-Fusionsprotein (bei ca. 39 kDa) immobilisiert werden konnten, wie aus den ähnlichen Bandenintensitäten geschlussfolgert wurde. Im Westernblot zeigte sich, dass für jede der untersuchten Varianten von GST-CsgE ein Komplex zusammen mit CsgG-His₆ eluiert werden konnte. Die Mengen an CsgG-His₆ in den Eluaten waren ähnlich und korrelierten mit den Mengen an GST-CsgE im SDS-PAGE.

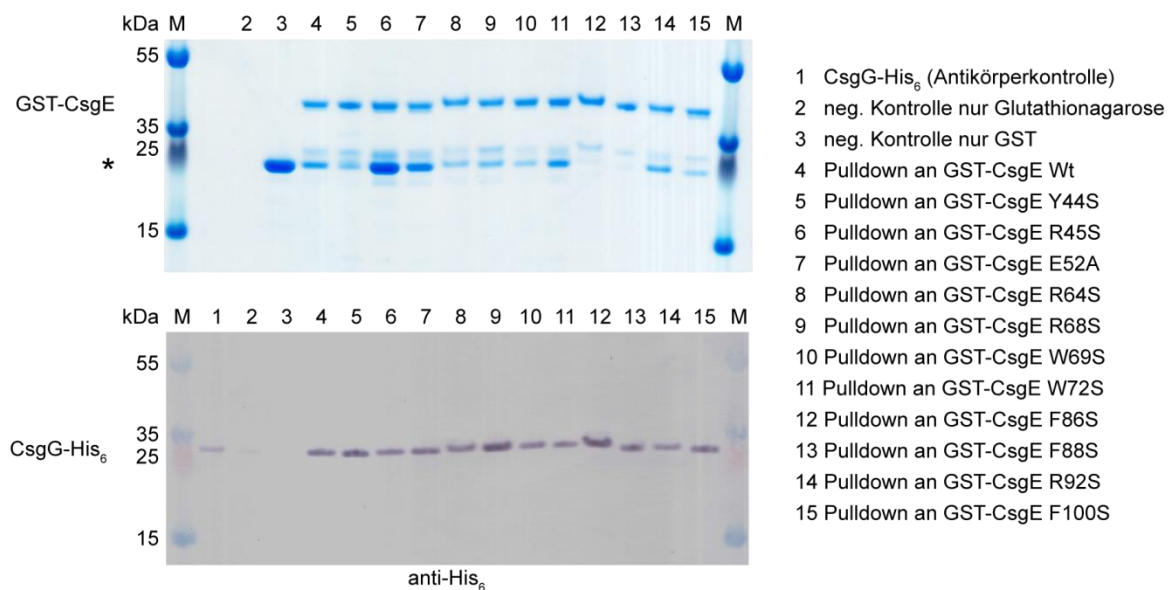


Abbildung 34: Bindung von CsgG-His₆ an verschiedene Varianten von GST-CsgE. Pulldown von CsgG-His₆ an GST-CsgE Wt und verschiedene Punktmutanten. **Oben:** SDS-PAGE (Coomassie-gefärbt), GST-CsgE bei 39 kDa, GST bei ca. 22 kDa, Sternchen: GST und Translationsabbruchprodukte aus der GST-CsgE Expression (20-26 kDa), die auch nach Gelfiltration nicht entfernt werden konnten. **Unten:** Westernblot mit anti-His₆-AP-Konjugat-Antikörper. Proben 1-15 siehe Legende. Molekulargewichtsmarker M.

Zusammenfassend musste festgestellt werden, dass keine der untersuchten Punktmutationen auf CsgE einen messbaren Einfluss auf die Bindung von CsgG-His₆ *in vitro* hatte. Daher wird vermutet, dass der *in vivo* beobachtete Effekt der Mutation F88S in CsgE nicht auf den Verlust der Bindung an CsgG

zurückzuführen war, sondern auf eine veränderte Porenregulation von CsgG hinweist (siehe Diskussion Abschnitt 5.5).

4.7 Strukturelle Charakterisierung von CsgF-His₆ in DHPC-Mizellen

4.7.1 CsgF liefert hochauflösende NMR-Spektren in Lösung mit Detergenzien

Neben der strukturellen Charakterisierung des periplasmatischen Proteins CsgE, welches eine wichtige Rolle in der Curlbiogenese von *E. coli* spielt, wurde in dieser Arbeit auch die Struktur von CsgF untersucht. Wie schon im Abschnitt 1.6 beschrieben ist CsgF an der äußeren Membran lokalisiert und wahrscheinlich in den Nukleationsprozess der Curlbildung involviert. Die Struktur und genaue Funktion von CsgF ist allerdings noch unbekannt.

Um strukturelle Studien an CsgF zu ermöglichen, wurde zunächst versucht CsgF löslich in *E. coli* BL21 überzuexprimieren und zu reinigen. Basierend auf der Erfahrung mit der relativ einfachen Handhabung des Fusionsproteins GST-CsgE wurde CsgF ebenfalls in den pGEX6p-Vektor kloniert, um ein GST-CsgF Fusionsprotein zu erzeugen. Dies brachte den Vorteil, dass nahezu native N- und C-Termini generiert werden konnten.

GST-CsgF konnte, wie in Abbildung 35 gezeigt wird, in *E. coli* BL21 überexprimiert und anschließend nativ über Glutathionagarose gereinigt werden. Die Ausbeute und Reinheit von gereinigtem GST-CsgF waren für eine weiterführende Charakterisierung ausreichend. Die proteolytische Spaltung des Fusionsproteins erfolgte, wie in Abschnitt 3.4.6 beschrieben, durch Zugabe von PreScission-Protease. Anschließend konnte CsgF vom abgespaltenen GST-Protein über eine reverse Affinitätschromatographie an Glutathionagarose abgetrennt werden. Gereinigtes CsgF war löslich und zeigte keine sichtbare Präzipitation im verwendeten 50 mM Tris-Puffer pH 8 bei Raumtemperatur. Lagerung bei 4 °C oder auf Eis führte überraschenderweise zur vollständigen Präzipitation des Proteins. Diese Präzipitation war reversibel nach Aufwärmung auf Raumtemperatur. Daher wurde mit CsgF im Anschluss immer bei mindestens 18 °C gearbeitet, um eine Präzipitation zu verhindern.

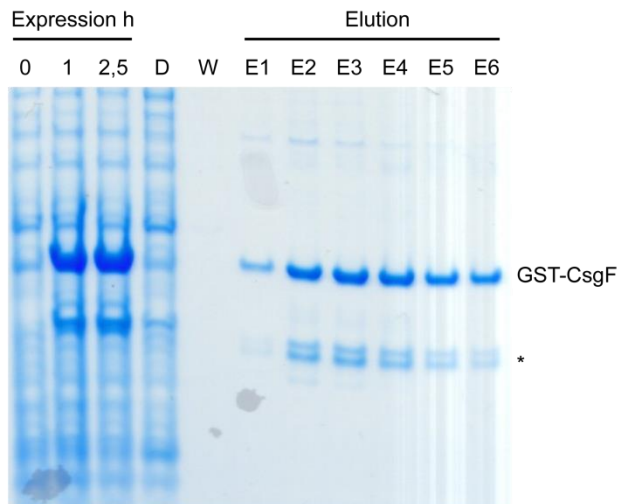


Abbildung 35: Reinigung von CsgF als GST-Fusionsprotein. D: Durchlauf Glutathion-Säule, W: Waschschrift, E: Elutionsfraktion, (*) Translationsabbruchprodukte

Um die Struktur von CsgF aufzuklären wurde zunächst analysiert, ob für diesen Zweck Lösungs-NMR eingesetzt werden konnte. Dazu wurde GST-CsgF in Minimalmedium mit dem Isotop ^{15}N markiert und ^{15}N CsgF anschließend, wie oben beschrieben, hergestellt. Im Anschluss daran wurde untersucht, unter welchen Messbedingungen ^{15}N CsgF hochauflösende NMR-Spektren lieferte. Verwendet wurden verschiedene Puffer im pH-Bereich von 5,5 bis 6,7, unterschiedliche Ionenstärken und Ionenarten. Untersucht wurde auch der Zusatz von geladenen Aminosäuren wie Arginin und Glutamat und der Einfluss von Detergenzien. Gereinigtes ^{15}N CsgF wurde mithilfe einer Entsalzungssäule in die NMR-Messpuffer gebracht und danach 2D ^{15}N -HSQC-Spektren bei 35 °C aufgenommen. Die ^{15}N -HSQC-Spektren von einigen der untersuchten Messbedingungen für ^{15}N CsgF sind in Abbildung 36 dargestellt. Das Spektrum in Phosphatpuffer pH 6,5 mit 250 mM NaCl war repräsentativ für die meisten der untersuchten Pufferbedingungen. Darin besaßen einige Resonanzen hohe Intensität und scharfe Linien, andere Signale zeigten eine deutliche Linienverbreiterung mit der einhergehenden Signalabschwächung. Diese spektrale Heterogenität könnte durch Oligomerisierung oder Mikroaggregation des Proteins bedingt gewesen sein, wobei hochflexible Abschnitte des Proteins weiterhin gut aufgelöste Signale lieferten.

Die Zugabe von Detergenzien, wie Octylglucosid, führte zu einer deutlichen Verbesserung der spektralen Qualität, wie in Abbildung 36 rechts unten zu erkennen ist. Die Resonanzen waren deutlich homogener in Bezug auf Signalintensität und Linienbreite als ohne Detergenz. Auch die Anzahl der

Ergebnisse

sichtbaren, aufgelösten Signale war höher und entsprach in etwa der erwarteten Anzahl von 117 Resonanzen (122 Reste minus 5 Proline minus N-terminalen Rest). Eine schmale Linienbreite von ca. 25 Hz wies auf CsgF im monomeren Zustand hin, wahrscheinlich im Komplex mit Detergenzmolekülen. Die Verteilung der Resonanzen des Proteinrückgrates über mehr als 2 ppm in der Protodimension (7,5 bis 9,6 ppm) zeigte, dass CsgF unter diesen Bedingungen gefaltet war.

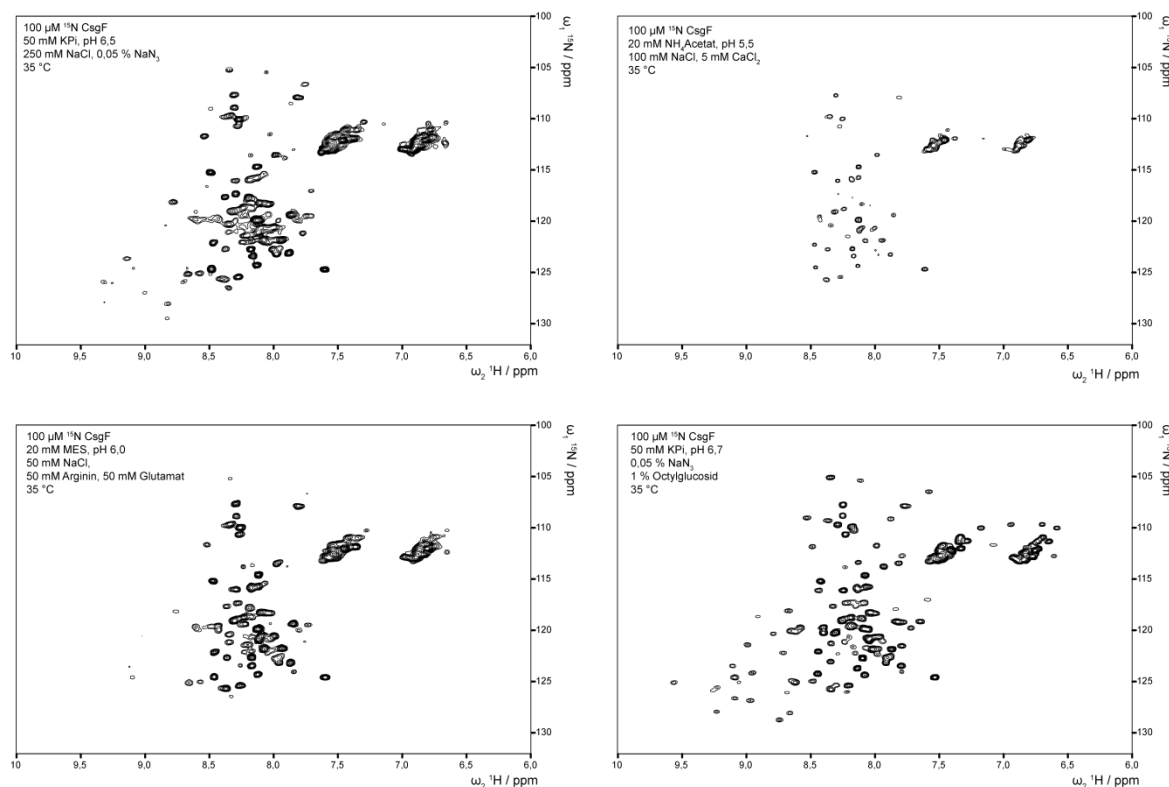


Abbildung 36: Optimierung der Messbedingungen für CsgF. Vergleich von ^{15}N -HSQC-Spektren von ^{15}N CsgF in verschiedenen Lösungen.

Neben Octylglucosid (Mizellengröße 8-29 kDa, (Lorber *et al.* 1990)) als Detergenz in Phosphatpuffer bei pH 6,5 wurde auch Dihexanoylglycerophosphocholin (DHPC) mit einer Mizellengröße von 12,3 kDa (Chou *et al.* 2004) ausprobiert, und erbrachte eine weitere Verbesserung der spektralen Auflösung durch Verringerung der Linienbreite. Bei der Messung der Langzeitstabilität des Proteins durch NMR zeigte sich, dass mit der Zeit deutliche Signalveränderungen im NMR-Spektrum auftraten. Es kam zu Signalverschiebungen, Verlust von einzelnen Signalen und Auftreten neuer Signale. Eine Analyse per SDS-PAGE zeigte, dass das Protein mit der Zeit proteolytisch abgebaut wurde (nicht dargestellt). Die Verwendung von Proteaseinhibitoren während des Herstellungsprozesses der NMR-Proben führte zu keiner Verbesserung. Da die Stabilität der Probe von entscheidender

Bedeutung für NMR-Experimente war, wurde ein anderer Weg gesucht, um CsgF herzustellen.

4.7.2 Rückgefaltetes CsgF-His₆ ermöglicht Lösungs-NMR-Strukturaufklärung

Im Folgenden wurde untersucht, ob ein anderer Herstellungsweg für eine stabile CsgF-Probe gefunden werden konnte, um eine NMR-Strukturaufklärung in DHPC-Mizellen zu ermöglichen. Dazu wurde ein CsgF-His₆ Konstrukt (pET11d-CsgF-His₆, Alexander Ebert HZI Braunschweig) in *E. coli* BL21 überexprimiert. CsgF-His₆ wurde überwiegend als Einschlusskörperchen von den Zellen hergestellt, sodass es im Anschluss denaturierend gereinigt und im immobilisierten Zustand auf einer Nickelaффinitätschromatographiesäule schrittweise rückgefaltet wurde (siehe Abschnitt 3.4.7). Wie in Abbildung 37 dargestellt ist, konnte CsgF-His₆ sehr rein und ohne Abbauprodukte hergestellt werden. Zur anschließenden Lagerung wurde CsgF-His₆ in 1 % (v/v) Essigsäure dialysiert und danach lyophilisiert. Das brachte den zusätzlichen Vorteil, dass zur NMR-Probenherstellung das getrocknete Protein nur im entsprechenden Puffer gelöst werden musste und keine Umpufferungsschritte mit DHPC nötig waren. Dies ermöglichte später auch die ökonomische Verwendung von deuteriertem d22-DHPC.

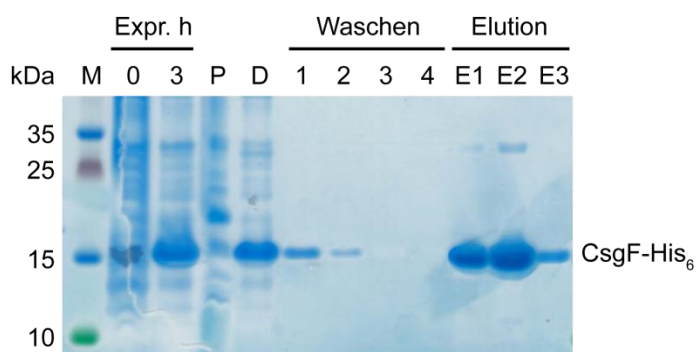


Abbildung 37: Denaturierende Reinigung und Rückfaltung von CsgF-His₆. Proteinstandard M, Expression Expr., Pellet P nach Zellaufschluss, Durchlauf Nickel-sepharose D, Elutionsschritte E nach der Rückfaltung. Stufengradient zur Rückfaltung von 8 M auf 0 M GuanidiniumHCl.

Um sicherzustellen, dass rückgefaltetes CsgF-His₆ die gleiche Struktur wie nativ hergestelltes CsgF besaß, wurde jeweils ein 2D ¹⁵N-HSQC-Spektrum von ¹⁵N-markiertem Protein gemessen.

Wie in Abbildung 38 gezeigt wird, wiesen nativ hergestelltes ¹⁵N CsgF und rückgefaltetes ¹⁵N CsgF-His₆ sehr ähnliche HSQC-Spektren auf. Die Positionen

der meisten Resonanzen sind identisch, nur wenige deutliche Unterschiede waren zu erkennen. Diese Unterschiede basierten auf den sequenziellen Unterschieden an den N- und C-Termini des Proteins (natives CsgF Glycin-Serin am N-Terminus zusätzlich, aber kein His₆ am C-Terminus), wie später durch die sequenzielle Zuordnung bestätigt werden konnte. NMR-Langzeitexperimente über zwei Wochen zeigten im Gegensatz zu nativem ¹⁵N CsgF keine spektralen Veränderungen, sodass Experimente zur Strukturaufklärung des Proteins fortgesetzt werden konnten.

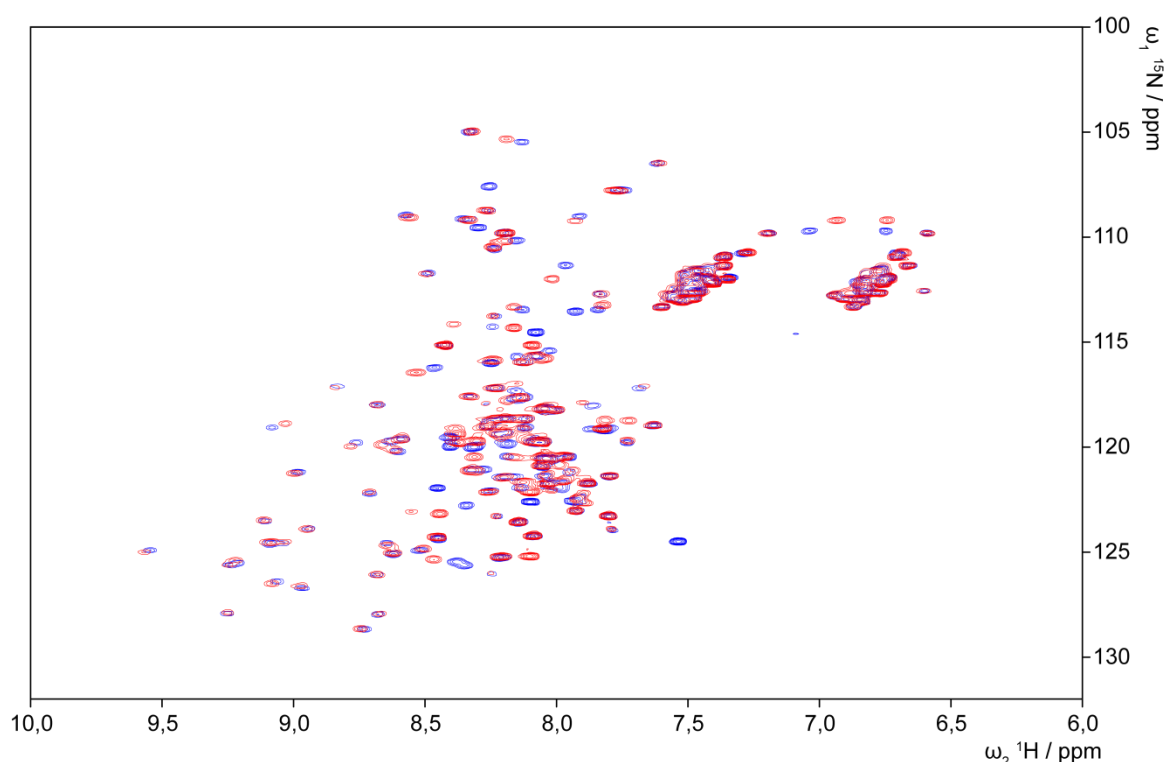


Abbildung 38: Vergleich von nativ gereinigtem ¹⁵N CsgF mit rückgefaltetem ¹⁵N CsgF-His₆. Überlagerung von ¹⁵N-HSQC Spektren des nativ gereinigten ¹⁵N CsgFs (blau) und denaturierend gereinigten und rückgefalteten ¹⁵N CsgF-His₆ (rot). Jeweils 100 µM CsgF bei 25 °C in 50 mM KPi, 0,05 % NaN₃, 25 mM DHPC, 6 % D₂O, pH 6,5. Spektrometer: Bruker 600 MHz Avance III.

4.7.3 NMR-Strukturaufklärung von CsgF-His₆

Durch die vorangegangenen Untersuchungen zur Optimierung der Messbedingungen zeigte sich, dass eine Lösungsstrukturaufklärung von rückgefaltetem CsgF-His₆ in DHPC-Mizellen möglich war.

Zunächst wurde eine Zuordnung des Proteinrückgrates angestrebt. Dazu wurde ¹³C/¹⁵N CsgF-His₆ hergestellt, lyophilisiert und in NMR-Probenpuffer gelöst (siehe dazu Abschnitt 3.8.6). Anders als in den vorherigen Tests wurden 100 mM DHPC

Ergebnisse

verwendet, da sich dies bei hohen Proteinkonzentrationen als notwendig für gute spektrale Auflösung herausstellte.

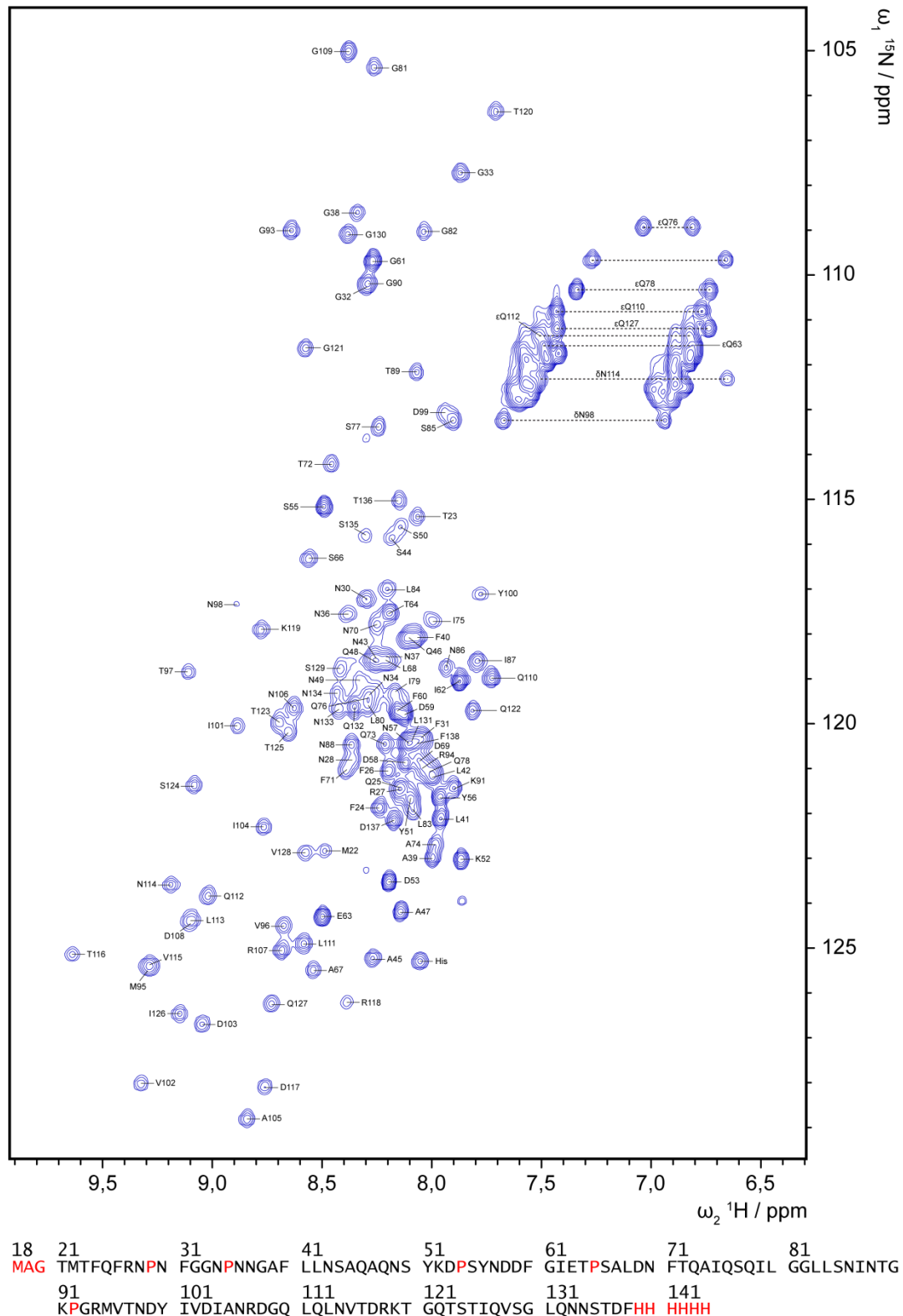


Abbildung 39: ^{15}N -HSQC-Spektrum von $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ CsgF-His₆. ^{15}N -HSQC Spektrum von 400 μM $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ CsgF-His₆ bei 37 °C in 50 mM KPi, 0,05 % NaN_3 , 100 mM DHPC, 6 % D_2O , pH 6,5. Zuordnung 113 von 121 erwarteten Resonanzen von insgesamt 127 Resten, nicht zugeordnete in rot. Gestrichelte Linien zeigen zusammengehörige Seitenkettenprotonen von Asparaginen bzw. Glutaminen an.

Für die Zuordnung des Proteintrückgrats wurden die Tripleresonanzspektren HNCO, HN(CA)CO, CBCA(CO)NH und HNCACB verwendet. Trotz der stark überlappenden Bereichen um 8 ppm im ^{15}N -HSQC-Spektrum (siehe Abbildung 39), konnten aufgrund der guten Auflösung im HNCO insgesamt mehr als 88 % aller Reste in CsgF-His₆ zugeordnet werden.

Nicht spektroskopisch sichtbar bzw. nicht aufgelöst waren der Abschnitt M18-G20 am N-Terminus und der C-terminale His₆ des Proteins.

Die Zuordnung der Aminosäureseitenketten konnte im Anschluss zum Teil mit den Experimenten HHN-TOCSY, HHN-NOESY, (H)CC(CO)NH und CN-NOESY durchgeführt werden. Kohlenstoff-editierte Experimente, wie ^{13}C -HSQC, HHC-TOCSY und HHC-NOESY konnten erst durch die Verwendung von teildeutertem d22-DHPC gemessen und ausgewertet werden. Auch diese Spektren waren durch sehr starke Überlappung der Signale vor allem im Bereich der Methylgruppen gekennzeichnet. Letztendlich konnten mehr als 79 % der Protonen und mehr als 69 % der Heteroatome im Protein zugeordnet werden.

Die Strukturrechnung von CsgF-His₆ wurde analog zur Strukturrechnung von CsgE-His₆ durchgeführt. Letztendlich konnten 1027 NOE-Kontakte zugeordnet und für die Strukturrechnung (Statistik siehe Tabelle 25) verwendet werden.

Mehr als 70 % aller NOE-Kontakte waren intraresiduell und sequenziell. Nur ca. 12 % der NOE-Kontakte besaßen lange Reichweite und fanden sich überwiegend am C-terminalen Teil des Proteins, wie im Anhang in Abbildung 51 dargestellt ist.

Ergebnisse

Tabelle 25: Strukturrechnungs- und Verfeinerungsstatistik für CsgF-His₆.

Parameter	Ergebnis	
	Strukturrechnung	nach Verfeinerung
NOE Distanzlimits gesamt	1027	
intraresiduell ($ i-j = 0$)	368 (35,8 %)	
sequenziell ($ i-j = 1$)	386 (37,6 %)	
mittlere Reichweite ($ i-j < 4$)	144 (14,0 %)	
lange Reichweite ($ i-j > 5$)	129 (12,6 %)	
Dihedrale Winkelbeziehungen	515	
Restwert der Zielfunktion (\AA^2)	$1,8 \pm 0,5$	
Restliche Verletzungen		
NOE $> 0,1 \text{ \AA}$		6 ± 2
Dihedrale Winkel $> 2,0^\circ$		19 ± 3
CNS-Energie PARALLHDG-Kraftfeld (kcal/mol)		
gesamt		$-4204,5 \pm 68,7$
van der Waals		$-367,0 \pm 15,8$
elektrostatisch		$-4711,8 \pm 72,7$
RMSD (\AA)		
Rückgrat (68-127) \AA		$5,77 \pm 1,75$
Schweratome (68-127) \AA		$6,28 \pm 1,77$
Ramachandran Statistik		
favorisiert %		65,2
erlaubt %		28,6
noch erlaubt %		2,8
nicht erlaubt %		3,4

Die Lösungsstruktur von CsgF-His₆ ist in Abbildung 40 als Bündel der fünf energieärmsten Strukturen und als Bänderdiagramm dargestellt. Das Bändermodell von CsgF-His₆ zeigte, dass sich die Struktur in drei kleine Domänen unterteilen lässt: eine N-terminale ungefaltete Domäne (ca. 48 Reste), eine 21 Reste lange α -Helix in der Mitte und ein C-terminales, antiparalleles β -Faltblatt bestehend aus vier β -Strängen.

Für die Bündeldarstellung wurden die Strukturen im Bereich des β -Faltblattes überlagert. Daraus wurde ersichtlich, dass keine einheitliche Orientierung der α -Helix zum β -Faltblatt für die Konformere aus den gemessenen Daten errechnet werden konnte. Auch eine manuelle Überprüfung aller Spektren ergab keine NOE-Kontakte zwischen diesen beiden Bereichen des Proteins. Dahingegen waren die einzelnen Sekundärstrukturelemente durch viele NOE-Kontakte gut definiert. Fast alle NOE-Kontakte mit langer Reichweite wurden im β -Faltblatt zwischen den

einzelnen Strängen gefunden (siehe Anhang Abbildung 51). Die Helix war besonders durch NOE-Kontakte von mittlerer Reichweite definiert.

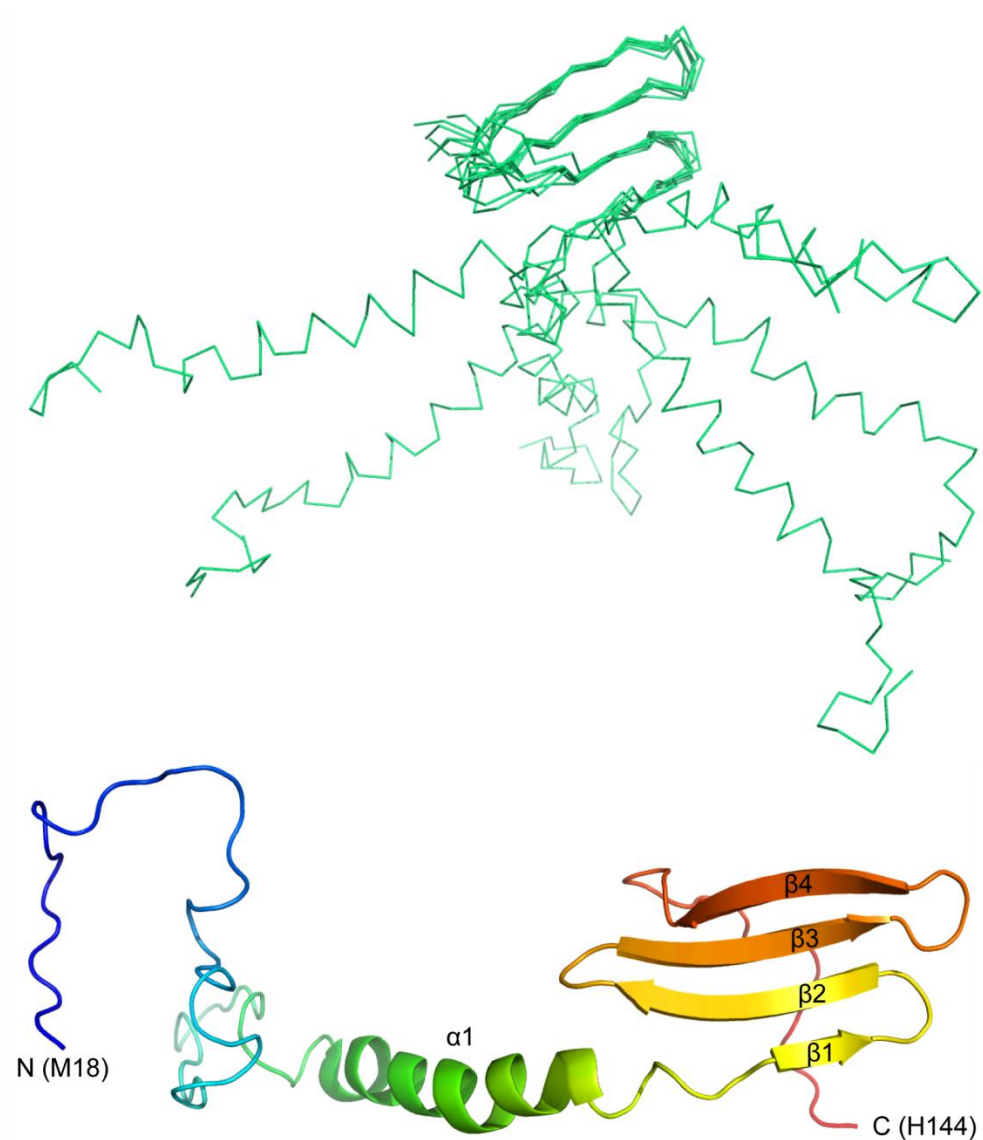


Abbildung 40: Lösungsstruktur von CsgF-His₆. Oben: Bündel der fünf berechneten Strukturen (Bereich von 53-130) mit geringster Energie. Die Strukturen wurden im Bereich des β-Faltblattes überlagert. Unten: Die Bänderdarstellung der Lösungsstruktur von CsgF-His₆ (18-144) zeigt eine lange N-terminale ungefaltete Domäne (49 Reste) gefolgt von einer α-Helix (α1). Die C-terminale Domäne besteht aus einem antiparallelen viersträngigen β-Faltblatt (β1-β4).

Bei der manuellen Analyse der NOESY-Daten konnten keine NOE-Kontakte zwischen Protein und DHPC identifiziert werden. Daher konnte nicht bestimmt werden, ob CsgF spezifisch mit DHPC interagiert und wo sich die entsprechende Interaktionsfläche dafür befand.

Da die Wechselwirkung zwischen CsgF und DHPC hydrophober Natur sein könnte, wurde die Hydrophobizität der Proteinoberfläche berechnet. Durch Berechnung des Oberflächenpotentials konnten zwei ungeladene, hydrophobe

Bereiche auf CsgF-His₆ identifiziert werden. Diese sind in Abbildung 41 dargestellt und mit I und II bezeichnet. Bereich I kennzeichnet einen hydrophoben Sequenzabschnitt von I79 bis L84 entlang von Helix α_1 , der keine geladenen oder polaren Reste enthält. Da dieser Abschnitt mehr als eine Helixwindung umfasste, war allerdings kein klarer amphipatischer Charakter zu erkennen. Bereich II kennzeichnet eine sehr hydrophobe Oberfläche auf dem C-terminalen β -Faltblatt, die von den Resten G93, M95, V102, I104, L113, V115, Q112, S124 und I126 gebildet wird. Die Rückseite des Faltblattes und die Schleifen zwischen den Strängen weisen einige geladene Reste auf und besitzen somit eher hydrophilen Charakter.

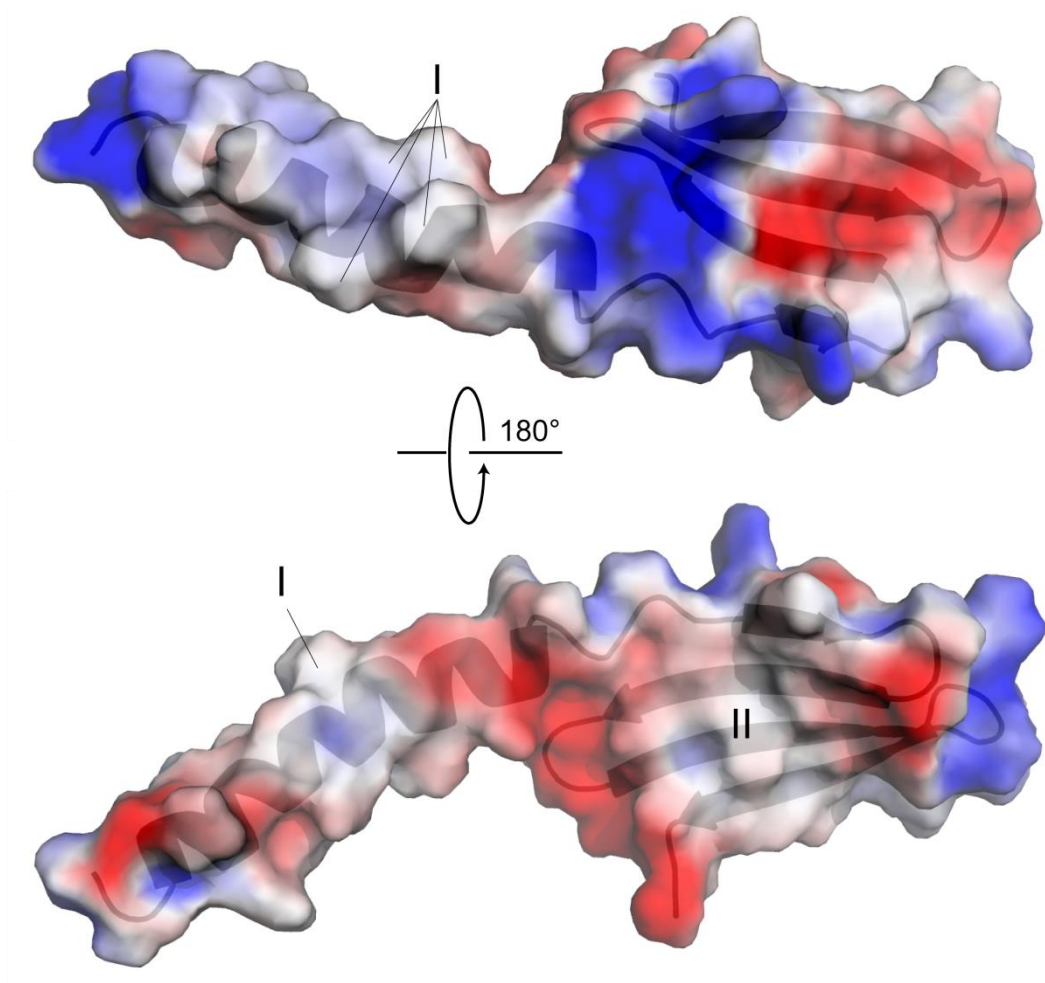


Abbildung 41: Oberflächenpotential von CsgF-His₆. Van-der-Waals Oberfläche von CsgF-His₆ (strukturierter Teil von 66-130) mit Darstellung des elektrostatischen Potentials negativ in rot, positiv in blau (berechnet mit Pymol APBS tools, DeLano Scientific, (Baker *et al.* 2001)). Die Bereiche I und II zeigen hydrophobe (ungeladene) Oberflächenbereiche im Protein.

5 Diskussion

Seit der Entdeckung der Curlifimbrien durch Olsen *et al.* im Jahr 1989 sind diese einzigartigen enterobakteriellen Amyloidfibrillen Gegenstand intensiver Forschung weltweit. Die meisten der publizierten Arbeiten untersuchten mit mikrobiologischen Methoden, wie Knockout-Mutagenese *in vivo*, z. B. (Hammar *et al.* 1995; Chapman *et al.* 2002), den Einfluss der beteiligten Proteine CsgA-G auf den Phänotyp der Curliproduktion. Durch interbakterielle Komplementation wurde das Modell der extrazellulären Nukleation und Präzipitation (ENP) aufgestellt (Chapman *et al.* 2002). Einige biochemische Analysen charakterisieren die Präzipitation und Nukleation während der Curlibiogenese aber auch *in vitro* (Hammer *et al.* 2007; Nenninger *et al.* 2011). Dennoch sind die Prozesse während der Curlibiogenese, vor allem der Transport der Curliuntereinheiten durch die äußere Membran, nicht genau verstanden, da die Strukturen der beteiligten Proteine CsgE, CsgF und CsgG bisher nicht bekannt waren. Von CsgG wurde von Taylor *et al.* ein Homologiemodell berechnet, dass eine oktamerische Membranpore mit großer periplasmatischen Domäne zeigt (Taylor *et al.* 2011). Außerdem konnten die Autoren der Studie die Kristallstruktur von CsgC lösen und zeigen, dass es sich bei CsgC um eine periplasmatische Oxidoreduktase handelt, welche höchstwahrscheinlich die Poreneigenschaften von CsgG verändert.

In der hier vorliegenden Arbeit werden nun die Strukturen von CsgE und CsgF präsentiert und für CsgE die Interaktion mit CsgA *in vitro* genauer charakterisiert.

5.1 Vergleich von CsgE mit Proteinen ähnlicher Topologie

Um die Struktur von CsgE Wildtyp zu lösen wurde zunächst versucht das Protein zu kristallisieren, um anschließend durch Röntgenstrukturanalyse die Kristallstruktur zu lösen. Leider war die Kristallisation nicht erfolgreich. Gründe dafür könnten in der beobachteten geringen Stabilität und Löslichkeit des Proteins *in vitro* liegen. Außerdem tendierte CsgE Wildtyp zur dynamischen Oligomerisierung und Mikroaggregation *in vitro*, beides Prozesse die eine

hochgeordnete Packung zu einem Kristallgitter verhindern können. Das verwendete Konstrukt besaß zudem einen nicht spaltbaren C-terminalen His₆-tag, der als zusätzlicher flexibler Bereich eine Kristallisation erschweren könnte.

Während der Optimierung der Proteinstabilität zeigte sich, dass CsgE Wildtyp bei pH 3 eine besonders hohe thermodynamische Stabilität aufwies, sehr gut löslich war und als Monomer vorlag. Diese Bedingungen sind für Lösungs-NMR sehr gut geeignet, woraufhin die NMR-Struktur von CsgE gelöst werden konnte.

Die NMR-Struktur besitzt mit einem RMSD von $0,87 \text{ \AA} \pm 0,15 \text{ \AA}$ eine hohe Präzision, da ungefähr ein Viertel aller NOE-Kontakte von langer Reichweite waren und somit die tertiäre Faltung des Proteins genau definieren. Die Struktur zeigt zwei α -Helices, die einem gemischten, viersträngigen β -Faltblatt sandwichartig gegenüberliegen. Das $\beta\alpha\beta\beta\alpha$ -Faltungsmotiv ist eine bekannte Domänentopologie, die erstmals für das Ribosomenbindeprotein Y (YfiA oder auch HI0257) beschrieben wurde und als *double stranded RNA binding domain* (dsRBD) bezeichnet wird (Parsons *et al.* 2001).

Eine Homologiesuche mit dem Dali-Server (Holm & Rosenström 2010) ergab signifikante Strukturhomologie (Z-score > 3) zu ungefähr 400 bekannten Strukturen, allerdings mit einer maximalen Sequenzidentität von nur 20 %. Dies zeigte, dass bis dahin noch keine Struktur eines Sequenzhomologs von CsgE vorhanden war, von dem Schlussfolgerungen über die Funktion abgeleitet werden konnten. Die größte Homologie zu CsgE besitzt ein Teil der periplasmatischen Domäne des Transkriptionsaktivators CadC (PDB: 3LY7; Z-score: 6,8; Seq.-ID: 13 %) und das Ribosomenbindeprotein Y (PDB: 3TQM; Z-score: 6,6; Seq.-ID: 17 %). CadC ist ein transmembraner Transkriptionsfaktor dessen periplasmatische Domäne ein Sensor für den Umgebungs-pH-Wert ist (Eichinger *et al.* 2011). Negativ geladene Reste im Dimerisierungsinterface der periplasmatischen Domäne von CadC sind essenziell für die pH-Wertabtastung und bewirken wahrscheinlich über Konformations- oder Oligomerisierungsänderung eine Signaltransduktion (Haneburger *et al.* 2011). Welche Rolle dabei die $\beta\alpha\beta\beta\alpha$ -Domäne spielt ist unklar.

Das Ribosomenbindeprotein Y, sowie auch das Strukturhomologe YfiA (PDB: 1N3G; Z-score: 5,2; Seq.-ID: 14 %) und der Ribosomenhibernationsfaktor HPF (PDB: 4FYI; Z-score: 6,5; Seq.-ID: 6 %), können an Ribosomen binden und sind in deren Hibernation während der stationären Phase involviert (Polikanov *et al.*

2012). Aus diesen Strukturhomologien ließen sich allerdings keine Rückschlüsse auf die Funktion von CsgE ziehen, da es keine Hinweise in der Literatur gab, dass CsgE an Ribosomenbindung beteiligt wäre. Außerdem handelt es sich bei CsgE um ein periplasmatisches Protein, welches nicht in Kontakt mit Ribosomen im Zytoplasma kommt.

Des Weiteren zeigt CsgE strukturelle Ähnlichkeit zur N-terminalen α/β -Domäne des periplasmatischen Proteins TolB (PDB: 2IVZ; Z-score: 5,1; Seq.-ID: 7 %). Als Teil des membrandurchspannenden Tol-Pal-Systems ist TolB in die Interaktion mit Pal in der äußeren Membran und mit TolA in der inneren Membran involviert, welche über die TolA-Box an der N-terminalen Domäne von TolB vermittelt wird (Walburger *et al.* 2002). Nur die 12 N-terminalen Reste der TolA-Box scheinen in die Interaktion mit TolA involviert zu sein, wobei sie geordnet oder ungeordnet vorliegen können (Bonsor *et al.* 2009). Der Zusammenhang zwischen Struktur und Funktion für den Rest der N-terminalen α/β -Domäne konnte bis heute noch nicht bestimmt werden, warum sich auch keine Rückschlüsse auf eine funktionale Homologie von CsgE ergeben.

Interessanterweise wurde auch für CsgG eine große strukturelle Homologie zur N-terminalen α/β -Domäne von TolB vorhergesagt (Taylor *et al.* 2011). Diese wurde dann von Taylor *et al.* benutzt um ein Homologiemodell der periplasmatischen Domäne von CsgG zu erstellen. Die transmembrane Domäne von CsgG wurde anhand der transmembranen Domäne der bekannten Struktur des Polysaccharidtransporters Wza aus *E. coli* modelliert. Zusammen zeigt das Modell von CsgG, in Einklang mit Kryoelektronenmikroskopiedaten, einen oktamerischen Ring, der die Membranpore darstellt (Taylor *et al.* 2011). Die periplasmatische α/β -Domäne von CsgG würde diesem Modell zur Folge also ringbildende Eigenschaften aufweisen, um eine Stabilität des gesamten CsgG-Komplexes zu gewährleisten. Da in CsgE eine homologe α/β -Domäne zu finden ist, könnte diese ebenfalls ringbildend sein und möglicherweise mit dem basalen Teil der CsgG-Pore interagieren. Hinweise für eine direkte Interaktion von CsgE und CsgG wurden von Robinson *et al.* und in der hier vorliegenden Arbeit durch Pulldownanalyse gegeben (Robinson *et al.* 2006). Ebenfalls auf eine Interaktion beider Proteine weist die Erkenntnis hin, dass eine CsgG-vermittelte Antibiotikasensitivität durch CsgE unterdrückt werden kann (Nenninger *et al.*

2011). Nenninger *et al.* schlussfolgern daraus, dass CsgE in einer Art Pförtnerfunktion den Import und Export über CsgG reguliert.

5.2 Die Sequenz und Struktur von CsgE ist evolutionär hochkonserviert

Curlifibrillen werden außer von *E. coli* auch von anderen Enterobakterien, wie *Salmonella spp.* oder *Citrobacter spp.* gebildet (Collinson *et al.* 1996; Zogaj *et al.* 2003). Untersuchungen zur *csg* Operonstruktur und Proteinsequenzkonservierung der *csg* Gene zeigen, dass die Curliproteine anders als andere Fimbrien hochkonserviert sind (Römling *et al.* 1998). Zwischen *Salmonella* und *Escherichia* zeigen die Proteine CsgG (96,0 %), CsgD (92,1 %), CsgE (91,4 %) und CsgF (89,9 %) die höchste Sequenzidentität. Etwas geringer aber immer noch hochkonserviert sind CsgB (82,1 %), CsgA (74,8 %) und CsgC (73,1 %). So ist es auch weniger überraschend, dass *csg* Gene aus *Salmonella typhimurium* die Curlibildung in *E. coli* komplementieren können (Römling *et al.* 1998).

Wie aus Abbildung 42 hervorgeht, ist die Sequenz von CsgE auch unter anderen curlibildenden Enterobakterien hochkonserviert. Die meisten Sequenzabweichungen finden sich in der C-terminalen α -Helix und in der Schleife S5, wobei viele der Veränderungen biochemisch konservativ sind und zu ähnlichem Seitenkettencharakter führen. In Abbildung 42 hervorgehoben sind die hochkonservierten Tryptophan- und Phenylalaninreste des aromatischen Clusters an der CsgE Oberfläche. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, führen die Mutationen W69S und F88S zu einer biochemischen Verhaltensänderung *in vitro*, wobei die Selbstassoziation von CsgE reduziert wird und das Protein monomerisiert. Aus der Arbeit von Ma *et al.* geht hervor, dass oberflächenexponierte Tryptophan- und Phenylalaninreste oft an Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligt sind (Ma *et al.* 2003). Einerseits beeinflussen Mutationen im aromatischen Cluster von CsgE die Selbstassoziation *in vitro*, andererseits konnte bis jetzt noch kein stabiles homogenes Oligomer für eine CsgE-Variante nachgewiesen werden, wie in Abschnitt 5.3, ausführlicher diskutiert wird.



Abbildung 42: Multiples Sequenzalignment für CsgE. Sequenzalignment und Darstellung der Sekundärstruktur von CsgE aus *Enterobacter cloacae* (Swissprot: J7GEC3), *Escherichia coli* K-12 (P0AE95), *Salmonella typhimurium* (P0A200), *Citrobacter freundii* (K8QVE5). (erstellt mit ClustalW2, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Die Reste W69, W72, F86 und F88 bilden das aromatische Cluster (rot). Die Reste I75, I82 und F/Y83 bilden die β -Ausstülpung (blau).

Ein weiteres interessantes, ebenfalls hochkonserviertes Merkmal in der Struktur von CsgE, ist die β -Ausstülpung direkt vor dem β -Strang $\beta 4$. Es beteiligt die Reste I75 in $\beta 3$ und I82 und F83 vor bzw. in $\beta 4$. Wie anhand der Struktur von CsgE gezeigt werden konnte, sind diese Reste über ein klar definiertes Wasserstoffbrückennetzwerk miteinander verbunden. Das Muster der Wasserstoffbrücken und die Bindungswinkel klassifizieren die β -Ausstülpung als antiparallel klassisch (C+), den am häufigsten vorkommenden β -Ausstülpungen (Richardson *et al.* 1978; Kabsch & Sander 1983; Chan *et al.* 1993). Die β -Ausstülpung ist sequenziell determiniert, wobei an Position 1 und X (vgl. Abbildung 19 B) häufig Valin, Leucin oder Isoleucin vorkommen und an Position 2 kleine Reste wie Glycin, Alanin oder Serin bevorzugt werden (Chan *et al.* 1993). Damit stellt in CsgE nur die große Seitenkette von F83 an Position 2 eine Ausnahme zur Statistik dar. Die β -Ausstülpung ist durch die α -helikale Konformation an Position 1 (I82) gekennzeichnet, die wiederum eine parallele Orientierung der Seitenketten von I82 und F83 zur Folge hat, anders als in einen regulären β -Strang mit abwechselnder Ausrichtung. Als hydrophobe Reste packen I82 und F83 gegen die α -Helix $\alpha 2$, welche selbst durch Konservierung der kurzen Reste A101 und A108 eine dichte hydrophobe Packung an dieser Stelle möglich

macht. Diese hydrophobe Wechselwirkung trägt wahrscheinlich maßgeblich zur strukturellen Integrität des Proteins bei.

Am häufigsten treten β -Ausstülpungen an den Kanten eines β -Faltblattes auf, um eine Elongation des Faltblattes und damit eine mögliche Aggregation des Proteins zu verhindern (Richardson & Richardson 2002). In der Struktur vom Zelladhäsionsprotein CD2 finden sich zwei β -Ausstülpungen an den gegenüberliegenden Kanten eines β -Faltblattes und induzieren in diesem einen Twist, der für die Dimerisierung des Proteins notwendig ist (Jones *et al.* 1992). Des Weiteren können β -Ausstülpungen in der Positionierung der Reste des aktiven Zentrums involviert sein, wie im Fall der Dihydrofolatreduktase (Howell *et al.* 1990). In jedem dieser Fälle stellen sie eine essenzielle Funktion für das entsprechende Protein dar.

Unter den Proteinen mit ähnlicher Topologie zu CsgE besitzt nur die α/β -Domäne von TolB eine β -Ausstülpung an vergleichbarer Stelle, die ebenfalls eine Packung zweier Reste eines β -Stranges gegen die gegenüberliegende Helix bewirkt. Dies könnte auch für TolB eine Stabilisierung der Tertiärstruktur bedeuten und eine Elongation des β -Faltblattes verhindern. Sollte für die α/β -Domäne von TolB eine Funktion beschrieben werden, die auch das Vorhandensein der β -Ausstülpung erklärt, könnten möglicherweise neue Rückschlüsse auf die Funktion von CsgE gezogen werden.

Bis heute kann die Funktion der β -Ausstülpung in CsgE aus der Struktur nicht geschlussfolgert werden, deutlich wird aber, dass die involvierten Reste zur strukturellen Integrität, über hydrophobe Wechselwirkungen, beitragen.

5.3 Die dynamische Selbstassoziation von CsgE *in vitro*

Die Oligomerisierung oder Selbstassoziation von Proteinen ist ein wichtiges Merkmal, welches oft mit der Funktion verknüpft ist. Die mit DLS durchgeführten Untersuchungen zur Oligomerisierung zeigten, dass der Wildtyp von CsgE *in vitro* Oligomere bildet, deren Molekulargewicht besonders vom pH-Wert, der Salzkonzentration und der Proteinkonzentration abhängig war. Dies belegten auch die Untersuchungen mit analytischer Gelfiltration und NMR. Dieses sehr heterogene Verhalten wies darauf hin, dass diese Selbstassoziation eher durch schwache Protein-Protein-Wechselwirkungen zustande kam und dynamisch war.

Es konnten keine Hinweise auf eine spezifische Oligomerisierung gefunden werden, die zu einem symmetrischen Multimer von CsgE führt. Auch durch die hier präsentierte Kristallstruktur von CsgE F88S, bei der sechs Monomere die asymmetrische Einheit besetzten, konnte aus den zahlreichen Kristallkontakten kein symmetrisches oligomeres CsgE-Ensemble abgeleitet werden. Die Charakterisierung des Proteins durch Oberflächenmutagenese zeigte ebenfalls ein sehr heterogenes Oligomerisierungsverhalten, erkennbar an unterschiedlichen Partikelgrößen und zum Teil hoher Polydispersität in der DLS. Die zwei Punktmutationen W69S und F88S im aromatischen Cluster von CsgE führten zur Monomerisierung des Proteins. Dies zeigte, dass das aromatische Cluster und die daraus resultierenden hydrophoben Interaktionen oder aber auch Kation- π -Interaktionen den größten Beitrag zur Selbstassoziation von CsgE liefern. Das Einbringen von polaren Gruppen, wie der Hydroxygruppe von Serin, hydrophilisiert diesen Bereich durch Reduktion des „hydrophoben Effektes“ und stört diese aromatischen Wechselwirkungen.

Interessanterweise führten die Punktmutationen W69S und F88S neben geringerer Selbstassoziation auch zu einer Erhöhung der thermodynamischen Stabilität *in vitro*, um ca. 10 °C bzw. 20 °C. Für CsgE F88S konnte anhand der Kristallstruktur nachgewiesen werden, dass S88 im Vergleich zu F88 eine zusätzliche stabilisierende Wasserstoffbrücke zwischen Seitenkette und Proteinrückgrat bildete. Eine Arbeit von Vogt und Argos schätzte ab, dass ca. 13 zusätzliche Wasserstoffbrücken eine Stabilitätssteigerung von bis zu 10 °C auslösen können (Vogt & Argos 1997). Es ist daher anzunehmen, dass eine einzige zusätzliche Wasserstoffbrücke keine Stabilitätssteigerung von ca. 20 °C hervorruft. Wie gezeigt werden konnte beteiligt sich S88 auch an einem ausgedehnten Wasserstoffbrückennetzwerk zwischen Wassermolekülen und Protein und könnte somit zu einer erheblichen Stabilisierung der Schleife S5 und damit des Proteins beitragen. Die Struktur von CsgE F88S gab keinen Aufschluss über die erhöhte Stabilität von CsgE W69S, da keine zusätzlichen Wasserstoffbrücken vorhergesagt werden konnten. Wahrscheinlich ist aber, dass die Hydroxygruppe von S69 eine lokale Reorientierung von Seitenketten und Proteinrückgrat bewirkt und sich entsprechende Wechselwirkungen ergeben.

Ein interessanter Zusammenhang besteht möglicherweise, zwischen der Monomerisierung von CsgE, durch Mutationen oder sauren pH, und der

Steigerung der thermodynamischen Stabilität. Der Einfluss des pH-Wertes auf die biochemischen Eigenschaften der Proteinoberfläche ist dabei nicht trivial und schwer vorherzusehen, da es auch zu einer Reorientierung der Seitenketten kommen kann. Es wäre aber für die *in vitro* Situation denkbar, dass die intermolekularen Proteinwechselwirkungen in einem CsgE-Komplex zur Destabilisierung des Monomers im Vergleich zum freien Monomer hervorrufen.

Vom Oligomerisierungszustand *in vitro* kann ohne Funktionalitätsnachweis nur schwer auf den Zustand *in vivo* geschlossen werden, wo sich Wechselwirkungen mit anderen Proteinen oder Membranen ergeben könnten. Ein möglicher Bindungspartner von CsgE ist die Transportpore CsgG mit der es wahrscheinlich einen stabilen Komplex bildet, wie aus der in dieser Arbeit durchgeführten Pulldownstudie hervorgeht und vorher auch schon bei Robinson *et al.* gezeigt wurde (Robinson *et al.* 2006). Die Abwesenheit des Bindungspartners CsgG *in vitro* führt zur Exposition, sonst geschützter, hydrophober Bereiche und kann über hydrophobe Effekte unspezifische Wechselwirkungen induzieren.

Aus dem Verhalten von isoliertem CsgE *in vitro* lässt sich daher nicht schlussfolgern, ob die beobachtete Selbstassoziation funktional ist. Zukünftige Studien, wie eine erfolgreiche Kristallisation von CsgE Wildtyp bei physiologischem pH-Wert, könnten zeigen, ob ein spezifisches Multimer von CsgE auch in Abwesenheit eines Bindungspartners *in vitro* existiert.

5.4 Die Komplexität der CsgE/CsgA Interaktion *in vitro*

An den Transportprozessen während der Curlibiosegenese sind, neben der schon erwähnten CsgE/CsgG-Interaktion, wahrscheinlich noch einige weitere Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligt. Eine noch ungeklärte Frage ist, wie die Curluntereinheiten CsgA und CsgB das Periplasma durchqueren können, ohne zu aggregieren. Die Gruppe um Matthew Chapman zeigte, dass CsgE eine hemmende Wirkung auf die Autoaggregation von CsgA *in vitro* ausübt, und schlussfolgert daraus eine mögliche Chaperone-ähnliche Funktion für CsgE (Nenninger *et al.* 2011).

Durch Lösen der NMR-Struktur von CsgE und Punktmutagenese konnten nun detaillierte Einblicke in die *in vitro* Interaktion von CsgE und CsgA durch PRE gewonnen werden. Obwohl das Experiment bei pH 3 mit CsgE Wildtyp und bei

pH 6,5 mit CsgE W69S durchgeführt wurde, war kein starker Einfluss der unterschiedlichen, pH-abhängigen Nettoladung von CsgE auf die Interaktion zu beobachten. Das Hauptepitop der Interaktion involviert neben der Schleife S3 auch das aromatische Cluster und eine hydrophobe Furche, gebildet aus $\beta 4$ und $\alpha 2$, und weist damit auf eine hydrophobe Interaktion hin.

Die Interaktion war auf der Seite von CsgA weniger selektiv, was bedeutet, dass aufgrund der repetitiven Sequenz von CsgA, unterschiedliche Teile von CsgA an CsgE binden können. Diese Annahme einer semiselektiven Interaktion wird auch durch die Beobachtung gestützt, dass unmarkiertes CsgA zur Linienverbreiterung im NMR-Spektrum von ^{15}N CsgE W69S führte, wobei aber keine Veränderungen der chemischen Verschiebungen auftraten.

Die Interaktion zeigte aber auch eine Präferenz zur N-terminalen Sequenzwiederholung (R1) von CsgA, was bedeuten könnte, dass in einem möglichen trimeren Komplex aus CsgG, CsgE und CsgA *in vivo* die N-terminale Exportsequenz N22 von CsgA in die Nähe von CsgG gelangt und einen Transport auslösen kann. Dies könnte eine Erklärung für die von Nenninger *et al.* beobachtete Effizienzsteigerung des CsgG-abhängigen Exports durch CsgE sein (Nenninger *et al.* 2011).

Dennoch ist diese *in vitro* Interaktion schwierig zu charakterisieren, da es sich um ein instabiles System handelt, welches von Präzipitation beeinträchtigt ist. Anhand der PRE-Experimente, der ThT-Studien und des Coaggregationsassays wurde festgestellt, dass CsgE und CsgA gegenseitig ihre Löslichkeit beeinflussen. Die Autoaggregation von CsgA wurde in Gegenwart von CsgE zwar verlangsamt, allerdings führte diese Interaktion zur Präzipitation von CsgE. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass CsgA einen β -Strang in die hydrophobe Furche von CsgE einlagert, welcher zur Verlängerung des β -Faltblattes von CsgE führt und damit CsgA stabilisiert. Dies könnte aber im Gegenzug eine Destabilisierung der β -Ausstülpung in CsgE induzieren und die strukturelle Integrität von CsgE beeinträchtigen. Während der sukzessiven Präzipitation von CsgE, verliert es seine inhibitorische Wirkung auf die CsgA-Autoaggregation, welches amyloidartig polymerisiert. Eine hemmende Wirkung von CsgE Wildtyp auf die Autoaggregation von CsgA *in vitro* haben auch schon Nenninger *et al.* beobachtet, allerdings geht aus deren Arbeit nicht hervor, ob es auch zur CsgA-induzierten Aggregation von CsgE kam (Nenninger *et al.* 2011).

Die beobachtete Präzipitation von CsgE wäre *in vivo* nicht sinnvoll, und ist daher wahrscheinlich ein *in vitro* Artefakt der Interaktion. Trotzdem könnte *in vivo* eine ähnliche Wechselwirkung stattfinden, wobei CsgE allerdings durch zusätzliche Bindung an CsgG stabilisiert wird.

Die ThT-Studien zur Autoaggregation von CsgA und der Coaggregationsassay, wiesen nicht darauf hin, dass die Selbstassoziation von CsgE die *in vitro* Interaktion beeinflusst. So zeigten oligomeres CsgE Wildtyp, wie auch gering selbstassoziiertes CsgE W69S und CsgE F88S ähnliches Interaktionsverhalten. Bis heute gibt es keine Hinweise auf eine Selbstassoziation oder Oligomerisierung von CsgE *in vivo*. Anzunehmen ist aber, dass in einem CsgG/CsgE-Komplex ein Teil der im CsgE-Monomer exponierten Oberfläche in die Bindung involviert ist, und somit nicht für die Interaktion mit CsgA, CsgB oder CsgF zur Verfügung steht. Letztendlich zeigen die Versuche, dass eine Beschreibung der CsgA/CsgE-Interaktion auf molekularer Ebene, unter Verwendung von autoaggregierenden CsgA, sehr schwierig ist. Zukünftige Studien könnten daher mit kurzen CsgA-Peptiden durchgeführt werden, welche keine aggregationsfähigen Eigenschaften aufweisen und somit einen Teil des *in vitro* Systems stabilisieren. Da auch teilweise die einzelnen Sequenzwiederholungen (R1, R3 oder R5) zur amyloidartigen Aggregation neigen (Wang *et al.* 2007), wären vielleicht halbe Sequenzwiederholungen geeignet.

Außerdem wäre das Wissen um die Struktur des CsgG/CsgE-Komplexes sehr hilfreich, aus dem sich mögliche Bindungsstellen für CsgA, aber auch CsgB und CsgF ergeben könnten. Diese sollten dann durch zielgerichtete Mutagenese genauer charakterisiert werden.

5.5 Die Mutation F88S in CsgE beeinträchtigt die Curlibildung *in vivo*

Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit, speziell der veränderten Selbstassoziation bzw. dem veränderten Oligomerisierungszustand von CsgE W69S und CsgE F88S, konnten in Kooperation mit der Gruppe von Matthew Chapman an der Universität Michigan *in vivo* Komplementationsstudien durchgeführt werden. Die daraus entstandenen, vorläufigen Ergebnisse werden

explizit als nicht zu dieser Arbeit gehörend behandelt, dürfen aber mit Genehmigung von Matthew Chapman hier gezeigt und diskutiert werden.

In den Komplementationsstudien wurde die Curliproduktion einer $\Delta csgE$ -Mutante untersucht, in der CsgE Wildtyp bzw. CsgE W69S, CsgE W72S oder CsgE F88S *in trans* exprimiert wurde. Zusätzlich wurde die im Gesamtzellextrakt vorhandene Menge an CsgA bzw. CsgE per Westernblot analysiert.

Wie aus Abbildung 43 hervorgeht, können sowohl CsgE Wildtyp als auch CsgE W69S und CsgE W72S die Curliproduktion, detektiert durch den amyloidbindenden Farbstoff Kongorot (KR), komplementieren. Die blassrote Färbung der Bakterien mit CsgE F88S weist auf eine unvollständige Komplementation mit geringer Curlibildung hin. Außerdem waren in dieser Mutante auch die Mengen an nachweisbarem CsgA deutlich reduziert. Überraschenderweise konnten für Bakterien mit CsgE W72S und CsgE F88S deutlich größere Mengen an jeweiligem CsgE, als für CsgE Wildtyp oder CsgE W69S, nachgewiesen werden.

Die erhöhten Mengen an CsgE W72S und CsgE F88S könnten mit einer höheren *in vivo* Stabilität dieser Proteine zusammenhängen. Für CsgE F88S korreliert dies mit einer um ca. 20 °C höheren thermodynamischen Stabilität *in vitro* (vgl. Abbildung 23). Für CsgE W72S können hier keine Vergleichswerte zur thermodynamischen Stabilität gegeben werden, da es noch nicht gelang das Protein, außer als GST-Fusionsprotein, rekombinant herzustellen. Im Gegensatz zur erhöhten Stabilität *in vitro*, wurde für CsgE W69S keine höhere *in vivo* Stabilität festgestellt.

Größere Proteinmengen könnten aber auch auf unterschiedliche Expressionsraten der einzelnen CsgE Varianten zurückzuführen sein, was durch quantitative Echtzeit-PCR auf mRNA-Ebene überprüft werden müsste.

Da für CsgE W72S und CsgE F88S höhere Mengen im Vergleich zu CsgE Wildtyp nachgewiesen wurden, zeigt dies, dass wahrscheinlich nicht die Menge an CsgE, sondern die Mutation selbst, ursächlich für die unvollständige Komplementation der Curlibildung war. Dies wird auch durch die vorherigen Analysen gestützt, bei denen CsgE *in trans* unterschiedlich stark exprimiert wurde, und kein signifikanten Einfluss auf die Curliproduktion beobachtet wurde (Nenninger *et al.* 2011).

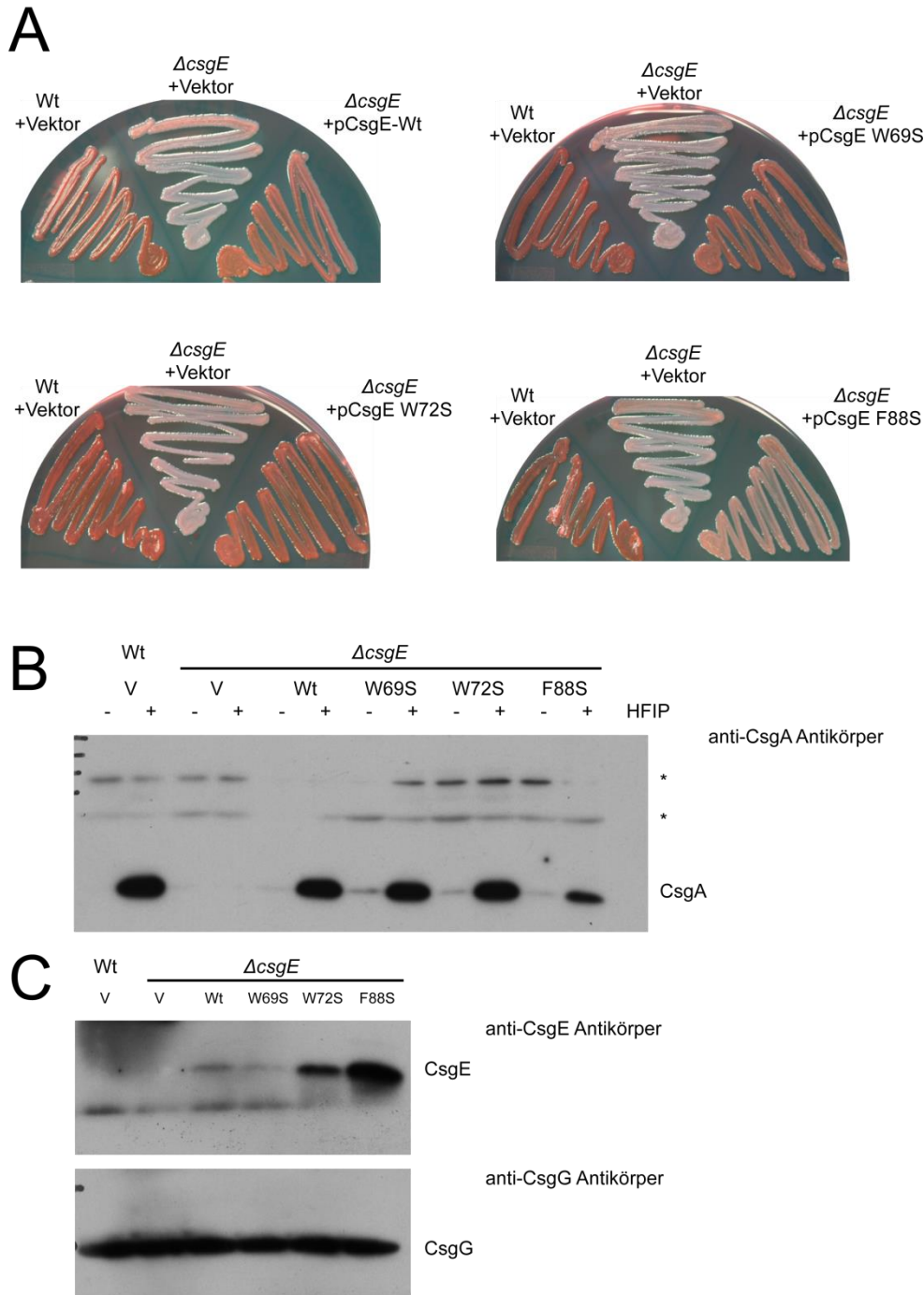


Abbildung 43: Komplementierung der Curlibildung durch Mutanten von CsgE *in vivo*. **A:** KR-YESCA-Agarplatten mit curlbildenden *E. coli* M4100 + leerer Vektor (links), $\Delta csgE$ -Mutante + leerer Vektor (Mitte), $\Delta csgE$ -Mutante + CsgE *in trans* vom Vektor (rechts). **B:** Westernblot zum Nachweis der CsgA Expression und Bildung SDS-unlöslicher Aggregate (HFIP Hexafluoroisopropanol, V leerer Vektor). Antikörperhintergrund (*). **C:** Westernblot zum Nachweis der Expression von CsgE Wt bzw. der CsgE-Mutanten und von CsgG. Endogene Mengen an CsgE sind mit dem anti-CsgE-Antikörper erfahrungsgemäß kaum nachweisbar. Diese Experimente wurden in Kooperation mit der Gruppe von Matthew Chapman (Universität Michigan) gemeinsam geplant und von Margery Evans (Universität Michigan) ausgeführt. Mit Genehmigung von Matthew Chapman werden die Ergebnisse hier gezeigt.

Wahrscheinlich handelt es sich bei dem für CsgE F88S beobachteten Phänotyp vielmehr um einen direkten, sich lokal-auswirkenden Effekt der Mutation auf die

Funktion des Proteins. Globale Veränderungen der Proteinstruktur im Vergleich zum Wildtyp, konnten anhand der Kristallstruktur von CsgE F88S ausgeschlossen werden. Des Weiteren zeigten die in dieser Arbeit durchgeführten Pulldownanalysen zur Bindung von CsgE und CsgG, dass die Mutation F88S keinen Einfluss auf die Interaktion beider Proteine *in vitro* hat. Daher ist wahrscheinlich auch *in vivo* die globale Wechselwirkung beider Proteine nicht beeinträchtigt. Dies wiederum würde den interessanten Schluss zulassen, dass CsgE F88S zwar mit CsgG *in vivo* einen Komplex bildet, in dem allerdings der selektive Transport durch die Pore stark eingeschränkt ist. Es wäre denkbar, dass die Schleife S5 von CsgE, in der sich auch F88 befindet, die Porenöffnung blockiert, um unspezifischen Import und Export von Makromolekülen zu verhindern. Daran könnten auch mehrere CsgE Moleküle beteiligt sein, die ringartig am basalen Teil der CsgG-Pore binden und dabei S5 jeweils radial zur Porenmitte zeigt. Die Punktmutation S88 könnte die Dynamik der Schleife S5 verändert haben, da eine zusätzliche Wasserstoffbrücke zu L90 gebildet wurde. Möglicherweise war eine Öffnung der Pore auch für spezifischen Transport so nicht mehr möglich und führte zum beobachteten Phänotyp.

Ein interessantes Beispiel eines solchen Porenverschlusses ist bei dem Polysaccharidexporter Wza von *E. coli* zu finden. Die basale Porenöffnung des oktamerischen Kanals wird mit insgesamt acht dynamischen Schleifen des R1 Ringes verschlossen, wobei ein konservierter Tyrosinrest eine zentrale Rolle spielt (Dong *et al.* 2006).

Zusammenfassend verdeutlichen sich somit die Hinweise, dass CsgE in einer Art Pfortnerfunktion, den Transport durch die CsgG-Pore effizient reguliert. Es wäre vorstellbar, dass allein die Effizienz dieses Transportes ausreicht, um eine periplasmatische Aggregation der Curluntereinheiten zu verhindern. Möglicherweise ist daher CsgE primär ein Transportbeschleuniger, als ein freies Chaperon in der Curlbiogenese.

5.6 Das Membranprotein CsgF - Mehr als ein Membrananker für Curli?

Neben der Struktur von CsgE wurde auch die Struktur von CsgF, eines weiteren Proteins der Curlibiogenese, in dieser Arbeit untersucht. Es wurden zwei unterschiedliche Methoden etabliert, um rekombinantes CsgF herzustellen, und eine Strukturaufklärung wurde anschließend durch Lösungs-NMR ermöglicht. Anhand nativ hergestellten CsgFs konnten die NMR-Messbedingungen optimiert werden, wobei sich zeigte, dass hochauflösende NMR-Spektren in Lösung, durch den Zusatz von Detergenzien, wie OG, oder kurzkettigen, zwitterionischen Lipiden, wie DHPC, gemessen werden können. Da es trotz der Verwendung von Proteaseinhibitoren zum proteolytischen Abbau und damit zur Instabilität des Proteins kam, wurde eine zweite Herstellungsmethode etabliert, wobei denaturiertes CsgF-His₆ im immobilisierten Zustand rückgefaltet wurde.

Durch NMR-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass sich die Konformationen von nativem und von rückgefaltetem CsgF in DHPC-Mizellen kaum unterscheiden. Dies bedeutet, dass CsgF in der Lage ist, selbst zu falten und eine Konformation anzunehmen, die höchstwahrscheinlich der des rekombinanten, löslichen CsgFs entspricht. Da es sich bei CsgF wahrscheinlich um ein Oberflächenprotein auf der äußeren Membran von *E. coli* handelt (Robinson *et al.* 2006; Nenninger *et al.* 2009), könnte eine solche Selbstfaltung auch *in vivo* stattfinden, entweder schon im Periplasma oder erst nach dem Export durch CsgG.

Die deutliche Verbesserung der NMR-Spektren durch Zugabe von Detergenzien bzw. Lipiden zeigt, dass es zur Interaktion von CsgF mit Lipid kommt, was die *in vivo* Interaktion mit der Membran simuliert.

Die NMR-Struktur von CsgF zeigt drei kleine Domänen, eine lange N-terminale flexible Domäne, eine helikale Domäne und ein viersträngiges, antiparalleles β -Faltblatt. Die Abwesenheit von NOE-Kontakten zwischen den Domänen lässt zwei Möglichkeiten zu. Zum einen könnten die einzelnen Domänen sich zueinander flexibel verhalten und keine einheitliche Orientierung einnehmen, oder aber es existiert eine spezifische Orientierung, z. B. zwischen Helix und Faltblatt, diese wird aber möglicherweise über eine gebundene Lipidmizelle vermittelt. Im ersten Fall wären aufgrund der Domänenbewegung keine Interdomänen-NOEs zu erwarten, im letzteren Fall wären wahrscheinlich die Interdomändistanzen zu groß,

um sie direkt über NOE zu detektieren. Zukünftige NMR-Studien könnten durch die Verwendung von *residual dipolar couplings* (RDC) die Orientierung einzelner Domänen zueinander zeigen, falls eine solche existiert.

Trotz des klaren Einflusses von DHPC auf die spektrale Qualität konnten keine direkten Protein-Lipid-Kontakte in Form von NOEs gefunden werden. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Protein-Lipid-Interaktion eher unspezifisch und heterogen ist. Proteine können sowohl hydrophobe Wechselwirkungen mit den Fettsäureketten der Lipide, als auch elektrostatische Wechselwirkungen mit den polaren, bzw. im Falle von DHPC geladenen, Kopfgruppen eingehen. Für CsgF ist beides denkbar, da es, wie in Abbildung 41 gezeigt wurde, sowohl hydrophobe als auch stark geladene Oberflächenbereiche besitzt. Ein denkbarer experimenteller Ansatz zur Charakterisierung dieser Interaktion, wäre die Verwendung einer hydrophoben paramagnetischen Substanz, wie 5-Doxylstearinsäure, welche sich in den Mizellen löst und zur Relaxation von ebenfalls innermizellären Proteinprotonen führt. Anhand von 2D-HSQC-NMR könnte somit die innermizelläre Proteinoberfläche kartiert werden.

Aufgrund der fehlenden Information zur Domänenorientierung von CsgF wurde keine Strukturhomologiesuche mit dem Dali-Server durchgeführt, da diese überwiegend auf Informationen von intramolekularen Distanzen, also der Tertiärstruktur, basiert (Holm & Rosenström 2010). Im Vergleich zu anderen curlbildenden Enterobakterien zeigt sich, wie auch schon für CsgE, dass die Sequenz und damit auch die Struktur hochkonserviert sind (siehe Abbildung 44). Neben der Helix und dem Faltblatt ist aber auch ein großer Abschnitt des flexiblen N-Terminus (von M22 bis G38) hochkonserviert. Interessanterweise zeigt sich im häufigen Auftreten der Aminosäuren Phenylalanin, Asparagin, Prolin und Glycin eine große biochemische Homologie zum flexiblen N-Terminus (N22) von CsgA. Da es sich bei N22 von CsgA höchstwahrscheinlich um ein CsgG-spezifisches Exportsignal handelt, ist eine ähnliche Rolle für den N-Terminus von CsgF denkbar, da, wie gezeigt wurde, beide Proteine beim Export miteinander konkurrieren (Nenninger *et al.* 2011). CsgF könnte dabei sogar im gefalteten oder teilgefalteten Zustand sekretiert werden, da die Porenöffnung groß genug ist, um auch nicht-curlverwandte Proteine von bis zu 145 Aminosäuren, wie CpxP (cpx-Stressantwortadapter) zu transportieren (Nenninger *et al.* 2011). Inwieweit es auch

nach dem Transport von CsgF zu Wechselwirkungen mit dem CsgG-Komplex kommt ist ungeklärt.



Abbildung 44: Sequenzalignment für CsgF aus verschiedenen Enterobakterien.
Sequenzalignment und Darstellung der Sekundärstruktur von CsgF aus *Enterobacter cloacae* (Swissprot: J7GJ61), *Escherichia coli* K-12 (P0AE98), *Salmonella typhimurium* (P0A202), *Citrobacter freundii* (K8QTJ4). (erstellt mit ClustalW2, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

In vivo beeinflusst CsgF sowohl die Stabilität des Nukleators CsgB als auch dessen Membranassoziation, was auch eine direkte Wechselwirkung beider Proteine sehr wahrscheinlich macht (Nenninger *et al.* 2009). Ob sich ein CsgF/CsgB-Komplex schon im Periplasma oder erst extrazellulär bildet, ist bis heute unklar. Es gibt keinen Hinweis, dass CsgB ein CsgG-spezifisches Exportsignal besitzt, und somit die spezifische Sekretion von CsgB erklären würde. Allerdings scheint der Transport von CsgB auch nicht von CsgF abhängig zu sein, wohl aber dessen Stabilität (Nenninger *et al.* 2009). Interessanterweise führt das Entfernen des C-Terminus in CsgB zu einem CsgF-defizient-ähnlichen Phänotyp *in vivo* (Hammer *et al.* 2007). Die vom C-Terminus abhängige Membranassoziation von CsgB und damit auch die zelloberflächenassoziierte Nukleation der Curlbiogenese könnte CsgF über das C-terminale β -Faltblatt vermitteln. Dabei wäre zum einen eine Verlängerung des CsgF-Faltblattes durch Anlagern eines C-terminalen β -Stranges von CsgB möglich, oder aber eine sandwichartige Assoziation von CsgB- und CsgF-Faltblättern. Wie allerdings Nenninger *et al.* festgestellt haben, ist das Vorhandensein von CsgF für die Membranassoziation von CsgB wichtig, aber nicht essenziell, und trotzdem Voraussetzung für eine zellassoziierte Curlpolymerisation (Nenninger *et al.* 2009).

Die Autoren der Studie deuten dies als mögliche chaperon-ähnliche Funktion von CsgF, welche die Faltung von CsgB in einen aktiven Nukleus unterstützt und damit indirekt die Curlinukleation ermöglicht.

Die in dieser Arbeit präsentierte Struktur von CsgF liefert somit erste Hinweise auf molekularer Ebene, wie CsgF in die Curlibiogenese involviert sein könnte. Die Domänenstruktur von CsgF könnte dabei mindestens drei mögliche Funktionen kombinieren: spezifischer signalsequenzabhängiger Transport durch die CsgG-Pore, Membranassoziation des CsgF/CsgB Komplexes und Formation eines aktiven CsgB-Nukleus.

6 Ausblick

Mit den hier präsentierten Strukturen von CsgE und CsgF sind zusammen mit der Struktur von CsgC (Salgado *et al.* 2011), bis heute drei einzelne Proteinstrukturen aus der Curlibiogenese bekannt. Einzelstrukturen von Proteinen, die Teil eines Komplexes sind, können oft aber nur begrenzt Auskunft über ihre Funktion liefern, da sie ihrem strukturellen Kontext *in vitro* entzogen wurden. Genauere Informationen über den funktionalen Kontext liefert oft nur der Proteinkomplex selbst. Da CsgG eine zentrale Rolle in der Curlibiogenese einnimmt, ist ein Verständnis der mechanistischen Abläufe wahrscheinlich nur über eine Struktur von CsgG im Komplex mit CsgE und/oder CsgF möglich. Eine Kristallstruktur eines CsgG/CsgE-Komplexes könnte zeigen, wie CsgE an CsgG bindet, wie viele Monomere von CsgE daran beteiligt sind und wie eine Öffnung bzw. ein Verschluss der Poren ermöglicht wird. Erste Anhaltspunkte für den Porenverschluss werden in dieser Arbeit durch Mutagenese geliefert und deuten auf die Beteiligung der Schleife S5 von CsgE hin.

Die Frage zur chaperon-ähnlichen Funktion von CsgE konnte hier nicht abschließend geklärt werden. Interessant wäre in diesem Zusammenhang, ob CsgE überhaupt frei im Periplasma vorkommt oder nur im an CsgG-gebundenen Zustand. Nur freies CsgE könnte dabei als Chaperon Curliuntereinheiten durch das Periplasma begleiten.

Weiterhin unklar ist, ob und wie CsgB und CsgF mit CsgE interagieren und wie ein spezifischer Transport dieser Proteine durch die CsgG-Pore ermöglicht wird. Auch hier könnten *in vitro* Interaktionsstudien weitere Anhaltspunkte geben.

Die hier präsentierte Lösungsstruktur von CsgF liefert erste Einblicke in die molekulare Grundlage der CsgF-Funktion. Weitere Studien sollten zeigen, wie CsgF mit der Membran assoziiert ist und wie es mit CsgB interagiert. Dabei wäre besonders der Einfluss von CsgF auf die Konformation von CsgB von Interesse, da nur beide zusammen einen aktiven membranassoziierten Nukleus *in vivo* formen können. In diesem Zusammenhang sind auch Untersuchungen wichtig, die zeigen, auf welche Art CsgB mit der Membran interagiert, da diese Interaktion scheinbar essenziell für die Zellassoziation von Curli ist.

Anhang

Zusätzliche Abbildungen

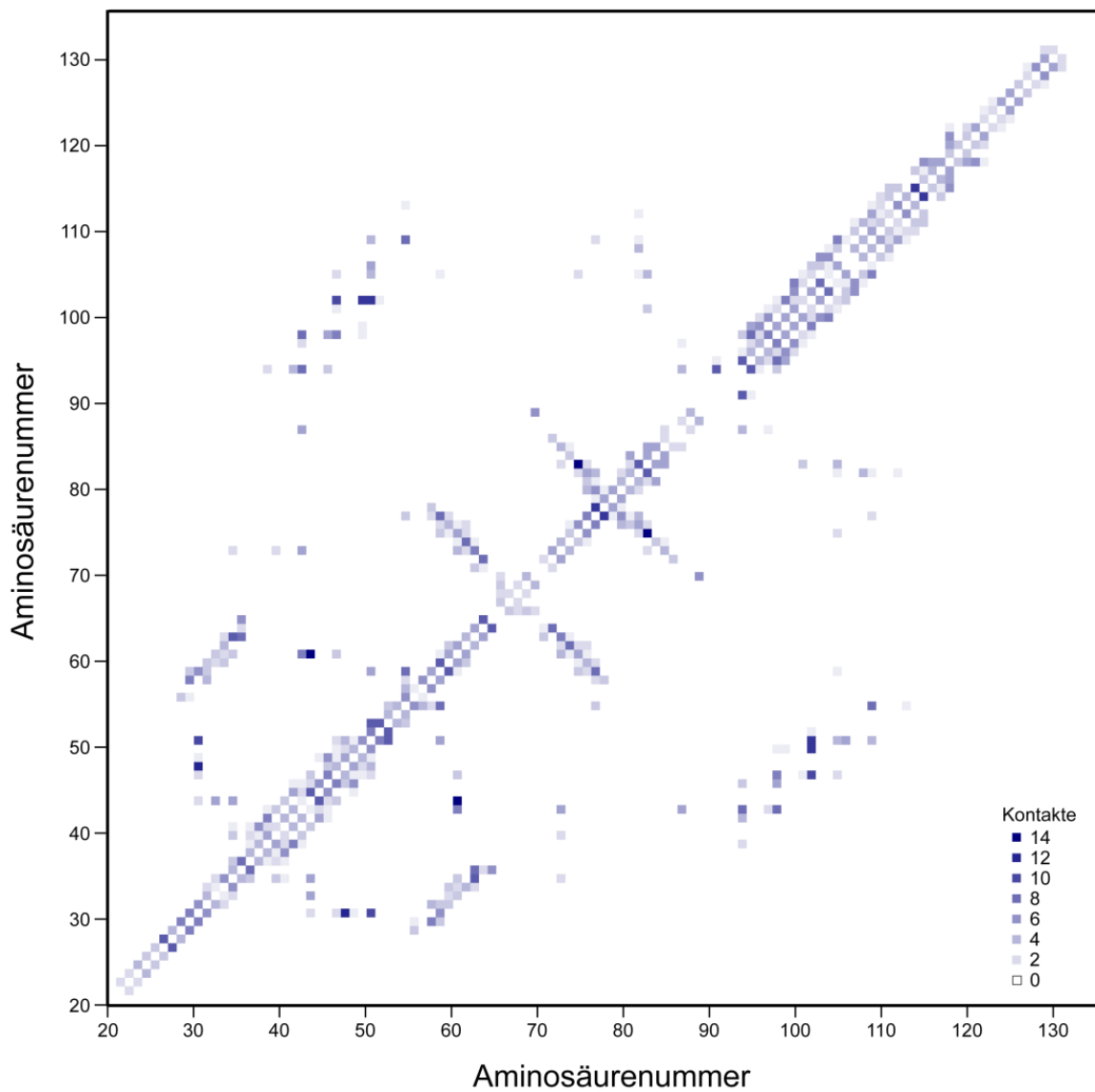


Abbildung 45: NOE-Distanz Dichtematrix CsgE-His₆. Dichte der NOE-Kontakte aus der Strukturrechnung für CsgE-His₆ bei pH 3. Diagramm erzeugt mit CCPN (Vranken *et al.* 2005).

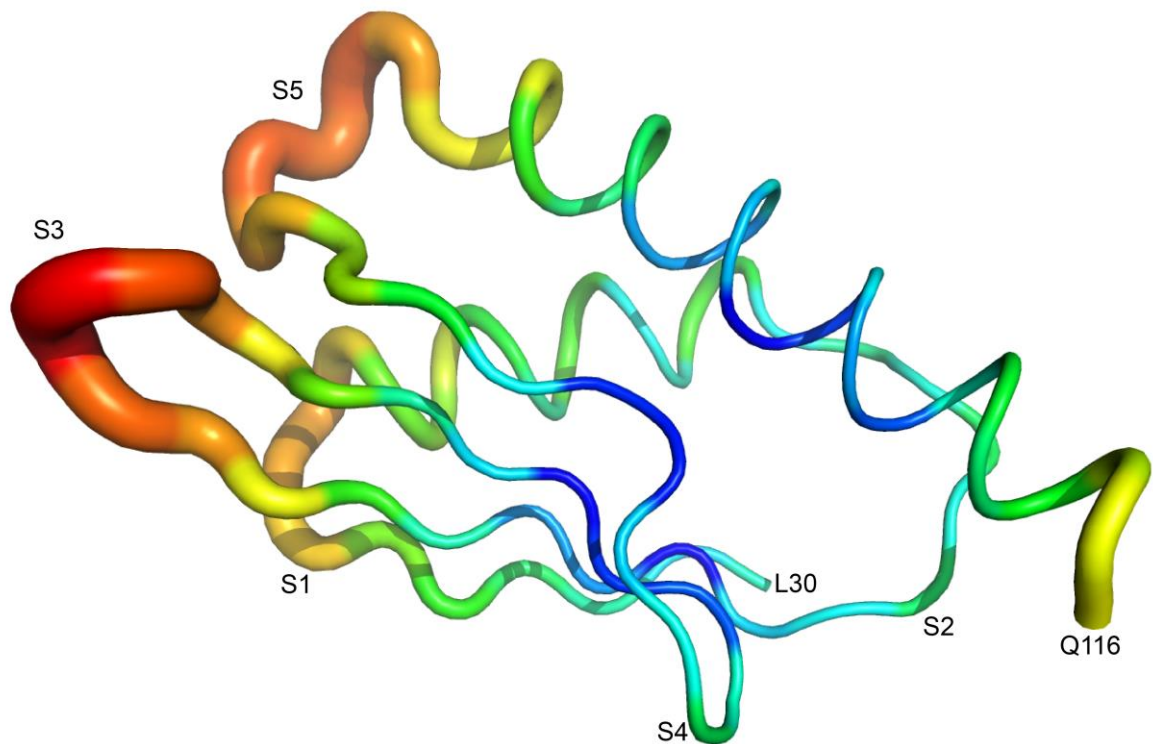
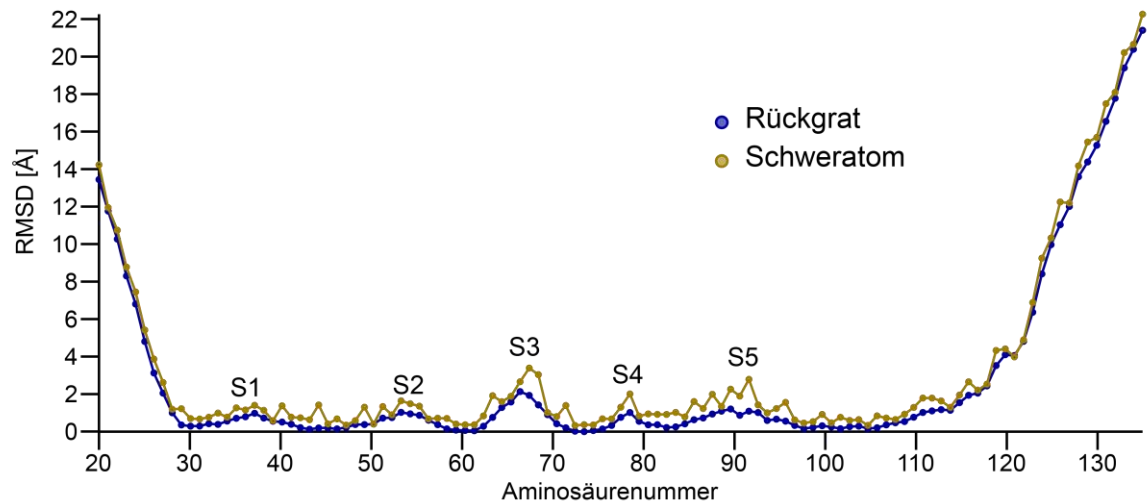


Abbildung 46: RMSD von CsgE-His₆. Oben: Durchschnittlicher RMSD der 20 Strukturen geringster Energie von CsgE-His₆. Diagramm erstellt mit CCPN (Vranken *et al.* 2005). Unten: Darstellung des RMSD auf der Struktur von CsgE-His₆ als Wurstdiagramm. Hoher RMSD in rot.

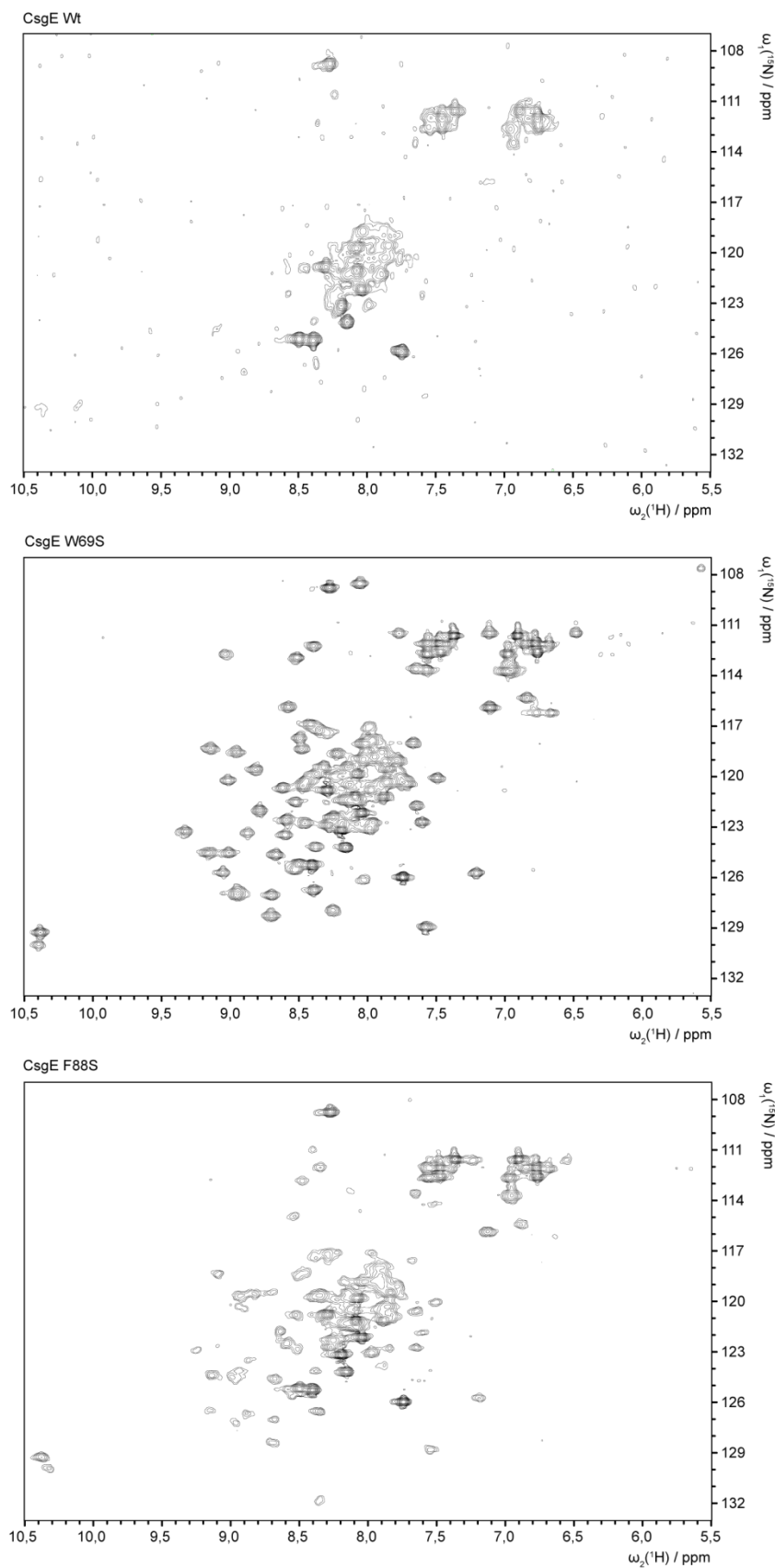


Abbildung 47: ^{15}N -HSQC-Spektren von CsgE Punktmutationen im Vergleich zum Wildtyp.
 ^{15}N -HSQC-Spektren bei 25 °C. **Oben:** 140 μM ^{15}N CsgE Wildtyp in 50mM KPi pH 8, 6 % D_2O .
Mitte: 250 μM ^{15}N CsgE W69S in 50 mM KPi pH 8, 150 mM NaCl, 6 % D_2O . **Unten:** 250 μM ^{15}N CsgE F88S in 50 mM KPi pH 8, 150 mM NaCl, 6 % D_2O . 600 MHz Bruker Avance III.

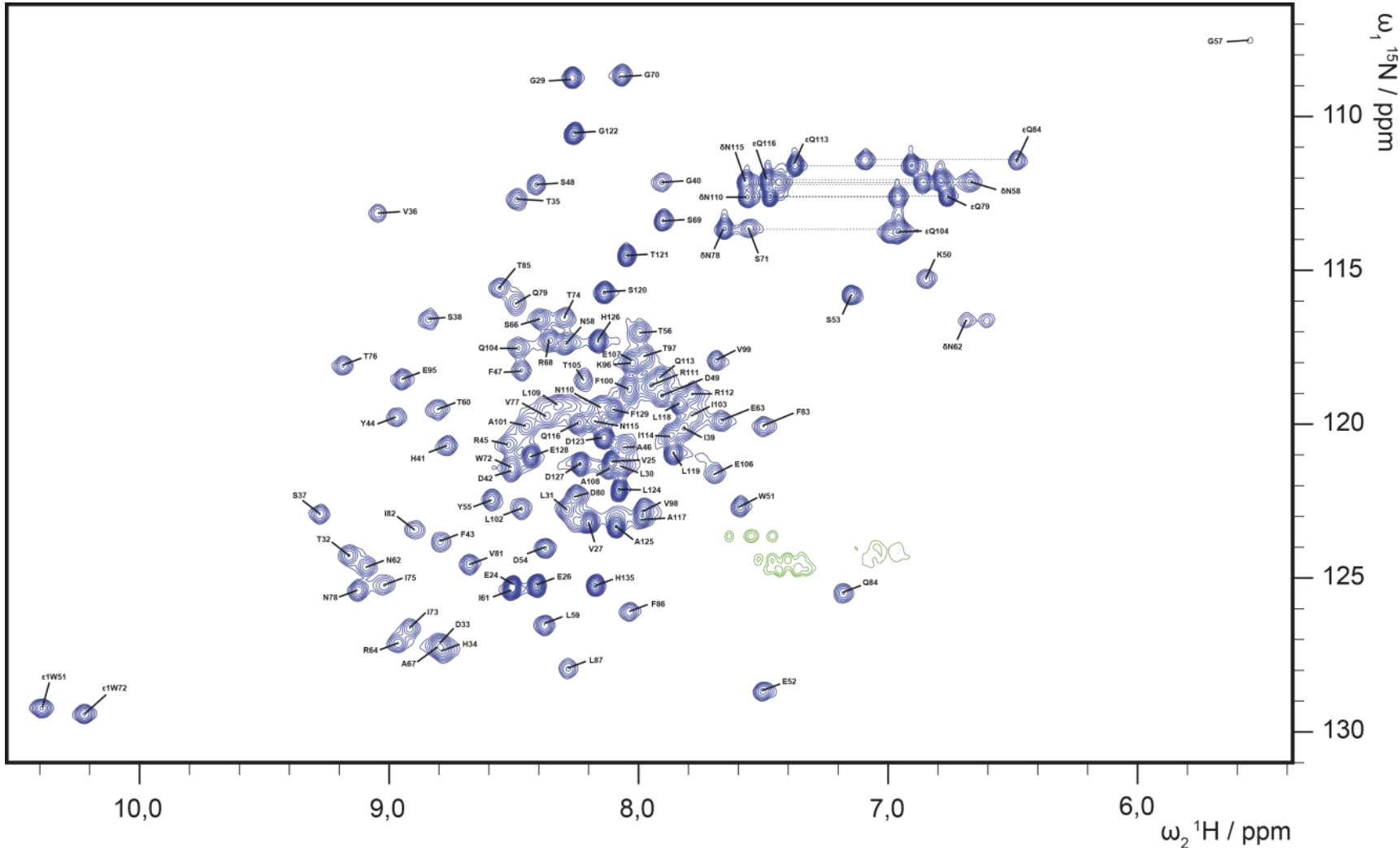


Abbildung 48: ^{15}N -HSQC von CsgE W69S bei pH 6,5. 300 μM $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ CsgE W69S bei 18 °C in 50 mM KPi, 250 mM NaCl, 0,05 % NaN_3 , pH 6,5. Die Resonanzen des Proteinerückgrates sind zugeordnet. Gestrichelte Linien deuten Paare von Seitenkettenamidprotonen der Asparagine und Glutamine an.

PRE mit CsgE Wt bei pH 3

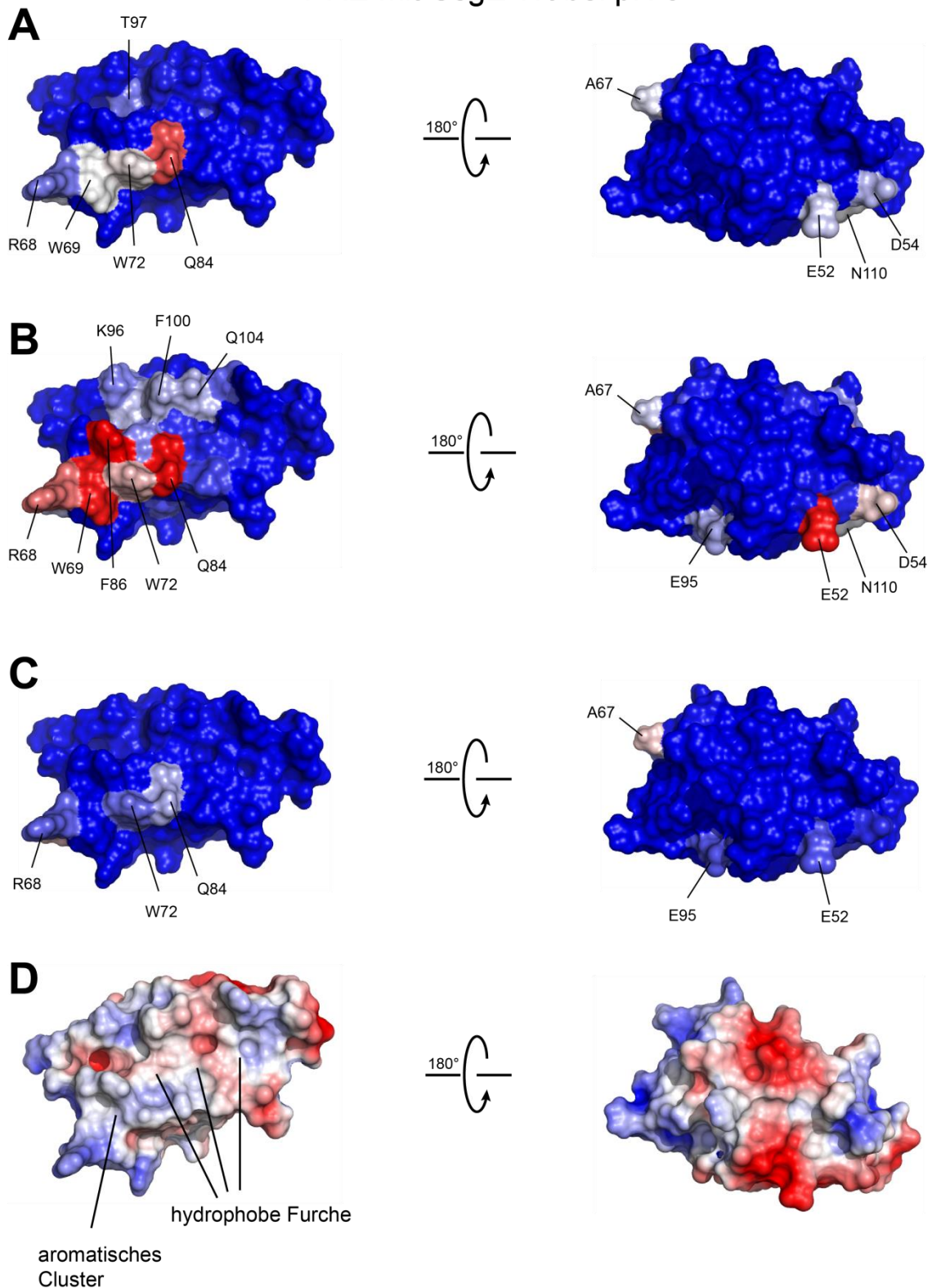


Abbildung 49: Durch PRE bei pH 3 relaxierte Protonen auf der Oberfläche von CsgE.

A: CsgA N46C-MTSL + ^{15}N CsgE Wt bei pH 3 im Verhältnis 1:1. **B:** CsgA S55C-MTSL + ^{15}N CsgE Wt bei pH 3 im Verhältnis 1:1. **C:** CsgA N136C-MTSL + ^{15}N CsgE Wt bei pH 3 im Verhältnis 1:1. Für A-C: Asn, Gln, Trp durchschnittlicher Signalverlust von Rückgrat- und Seitenkettenresonanzen, mit doppelter Gewichtung der Seitenkette. **D:** Elektrostatistische Oberfläche (negativ geladen in rot, positiv geladen in blau) von CsgE berechnet mit APBS-tools in Pymol, DeLano Scientific, (Baker *et al.* 2001).

PRE mit CsgE W69S bei pH 6,5

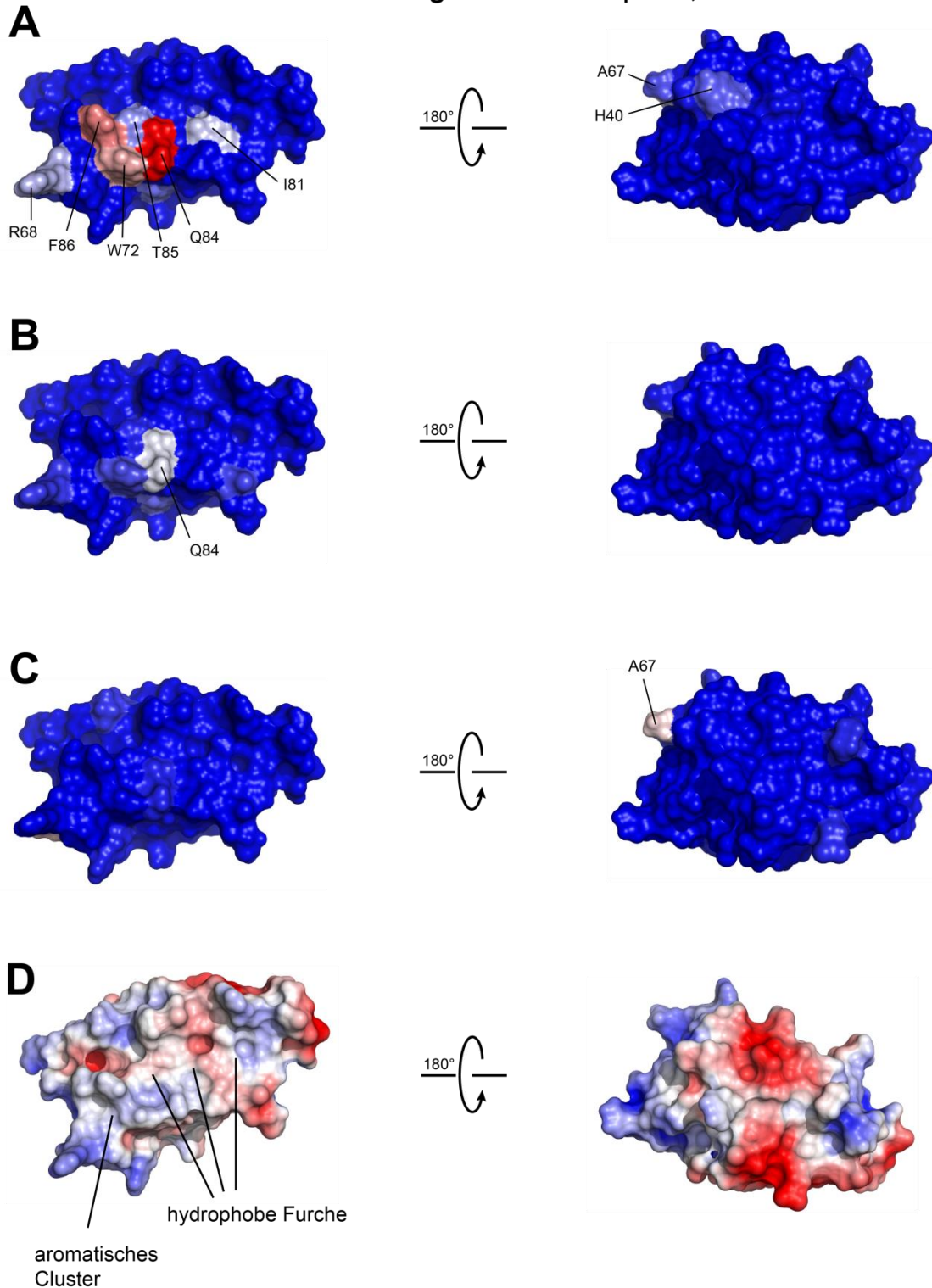


Abbildung 50: Durch PRE bei pH 6,5 relaxierte Protonen auf der Oberfläche von CsgE. A: CsgA N46C-MTSL + ^{15}N CsgE W69S bei pH 6,5 im Verhältnis 1:5. **B:** CsgA S55C-MTSL + ^{15}N CsgE W69S bei pH 6,5 im Verhältnis 1:5. **C:** CsgA N136C-MTSL + ^{15}N CsgE W69S bei pH 6,5 im Verhältnis 1:5. Für A-C: Asn, Gln, Trp durchschnittlicher Signalverlust von Rückgrat- und Seitenkettenresonanzen, mit doppelter Gewichtung der Seitenkette. **D:** Elektrostatische Oberfläche (negativ geladen in rot, positiv geladen in blau) von CsgE berechnet mit APBS-tools in Pymol, DeLano Scientific, (Baker *et al.* 2001).

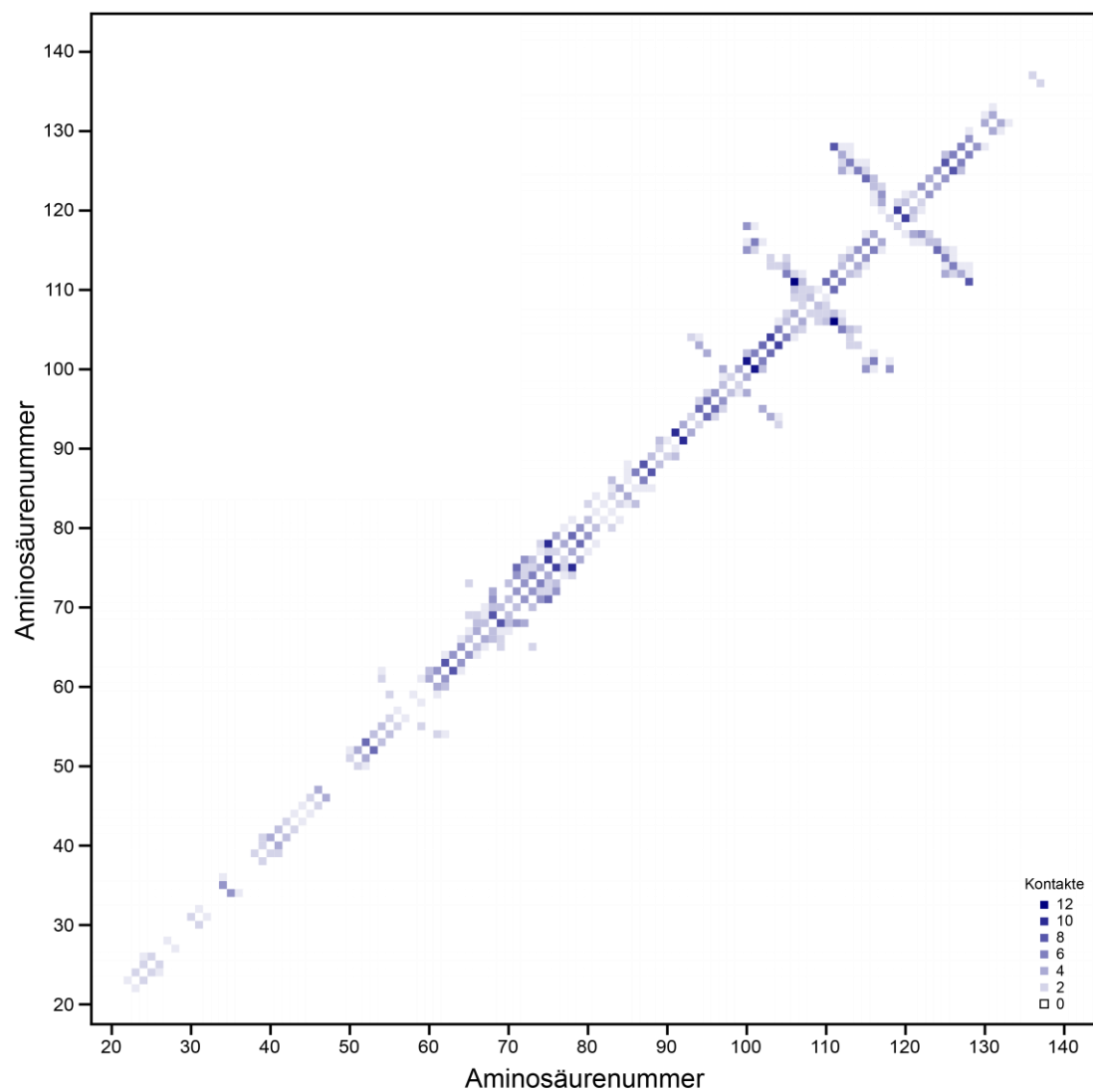


Abbildung 51: NOE-Distanz Dichtematrix CsgF-His₆. Dichte der NOE-Kontakte aus der Strukturrechnung für CsgF-His₆ in 100 mM DHPC. Diagramm erzeugt mit CCPN (Vranken *et al.* 2005).

Aminosäuresequenzen

CsgA (*Escherichia coli*):

```
1 MKLLKVAIA AIVFSGSALA GVVPQYGGGG NHGGGNNNSG PNSELNIYQY GGGNSALALQ
61 TDARNSDLTI TQHGGGNGAD VGQGSDDSSI DLTQRGFGNS ATLDQWNGKN SEMTVKQFGG
121 GNGAAVDQTA SNSSVNVTVQV GFGNNATAHQ Y
```

CsgE (*Escherichia coli*):

```
1 MKRYLRWIVA AEFLFAAGNL HAVEVEVPGL LTDHTVSSIG HDFYRAFSDK WESDYTGNTL
61 INERPSARWG SWITITVNQD VIFQTFLFPL KRDFEKTUVF ALIQTEEALN RRQINQALLS
121 TGDLAHDEF
```

CsgF (*Escherichia coli*):

```
1 MRVKHAVVLL MLISPLSWAG TMTFQFRNPN FGGNPNNGAF LLNSAQQNS YKDPSYNDDF
61 GIETPSALDN FTQAIQSQIL GGLLSNINTG KPGRMVTNDY IVDIANRDGQ LQLNVTDRKT
121 GQTSTIQVSG LQNNSTDF
```

CsgG (*Escherichia coli*):

```
1 MQRLFLLVAV MLLSGCLTAP PKEAARPTLM PRAQSYKDLT HLPAPTCHKIF VSVYNIQDET
61 GQFKPYPASN FSTAVPQSAT AMLVTALKDS RWFIPLERQG LQNLNLERKI IRAAQENGTV
121 AINNRIPLQS LTAANIMVEG SIIGYESNVK SGGVGARYFG IGADTQYQLD QIAVNLRVVN
181 VSTGEILSSV NTSKTILSYE VQAGVFRFID YQRLLEGEVG YTSNEPVMLC LMSAIETGVI
241 FLINDGIDRG LWDLQNKAR QNDILVKYRH MSVPPES
```

CsgA-His₆ in pET11d:

```
1 MGVPVQYGGG GNHGGGNNNS GPNSSELNIYQ YGGGNSALAL QTDARNSDLT ITQHGGGNGA
61 DVGQGSDDSS IDLTQRGFGN SATLDQWNGK NSEMTVKQFG GGNGAAVDQT ASNSSVNVTVQ
121 VGFGNNATAH QYHHHHHH
```

CsgE-His₆ in pET11d:

```
1 MAVEVEVPGL LTDHTVSSIG HDFYRAFSDK WESDYTGNTL INERPSARWG SWITITVNQD
61 VIFQTFLFPL KRDFEKTUVF ALIQTEEALN RRQINQALLS TGDLAHDEFH HHHHH
```

GST-CsgE in pGEX6p:

```
1 MSPILGYWKI KGLVQPTRLL LEYLEEKYEE HLYERDEGDK WRNKKFELGL EFPNLPYYID
61 GDVKLTQSMA IIRYIADKHN MLGGCPKERA EISMLEGAVL DIRYGVSRJA YSKDFETLKV
121 DFLSKLPEML KMFEDRLCHK TYLNGDHVTH PDFMLYDALD VVLYMDPMCL DAFPKLVCFK
181 KRIEAIPIQID KYLKSSKYIA WPLQGWQATF GGGDHPPKSD LEVLFOGPLG SAVEVEVPGL
241 LTDHTVSSIG HDFYRAFSDK WESDYTGNTL INERPSARWG SWITITVNQD VIFQTFLFPL
301 KRDFEKTUVF ALIQTEEALN RRQINQALLS TGDLAHDEF
```

CsgF-His₆ in pET11d:

```
1 MAGTMTFQFR NPNFGGNPNN GAFLNSAQQA QNSYKDPSYN DDFGIETPSA LDNFTQAIQS
61 QILGGLLSNI NTGKPGRMVT NDYIVDIANR DGQLQLNVTD RKTGQTSTIQ VSGLQNNSTD
121 FHHHHHH
```


GST-CsgF in pGEX6p:

```
1  MSPILGYWKI  KGLVQPTRL  LEYLEEKYEE  HLYERDEGDK  WRNKKFELGL  EFPNLPYYID
61  GDVKLTQSMA  IIRYIADKHN  MLGGCPKERA  EISMLEGAVL  DIRYGVSRIA  YSKDFETLKV
121 DFLSKLPEML  KMFEDRLCHK  TYLNGDHVTH  PDFMLYDALD  VVLYMDPMCL  DAFPKLVCFK
181 KRIEAIQID  KYLKSSKYIA  WPLQGWQATF  GGDHPPKSD  LEVLFQGPLG  SAGTMTFQFR
241 NPNFGGNPNN  GAFLNSAQA  QNSYKDPSYN  DDFGIETPSA  LDNFTQAIQS  QILGGLLSNI
301 NTGKPGRMVT  NDYIVDIANR  DGQLQLNVT  RKTGQTSTIQ  VSGLQNNSTD  F
```

Quellenverzeichnis

- Adams, P. D., P. V. Afonine, et al. (2010). "PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution." *Acta Crystallographica Section D* 66(2): 213-221.
- Alberti, S., R. Halfmann, et al. (2009). "A Systematic Survey Identifies Prions and Illuminates Sequence Features of Prionogenic Proteins." *Cell* 137(1): 146-158.
- Allen, W. J., G. Phan, et al. (2012). "Pilus biogenesis at the outer membrane of Gram-negative bacterial pathogens." *Current Opinion in Structural Biology* 22(4): 500-506.
- Arnqvist, A., A. Olsén, et al. (1992). "The Crl protein activates cryptic genes for curli formation and fibronectin binding in *Escherichia coli* HB101." *Molecular Microbiology* 6(17): 2443-2452.
- Ausubel, F. M., R. Brent, et al. (2007). *Current protocols in molecular biology*, John Wiley & Sons Inc.
- Baker, N. A., D. Sept, et al. (2001). "Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(18): 10037-10041.
- Barnhart, M. M. and M. R. Chapman (2006). "Curli Biogenesis and Function." *Annual Review of Microbiology* 60(1): 131-147.
- Baxa, U., V. Speransky, et al. (2002). "Mechanism of inactivation on prion conversion of the *Saccharomyces cerevisiae* Ure2 protein." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(8): 5253-5260.
- Bian, Z., A. Brauner, et al. (2000). "Expression of and Cytokine Activation by *Escherichia coli* Curli Fibers in Human Sepsis." *Journal of Infectious Diseases* 181(2): 602-612.
- Bieler, S., L. Estrada, et al. (2005). "Amyloid Formation Modulates the Biological Activity of a Bacterial Protein." *Journal of Biological Chemistry* 280(29): 26880-26885.
- Bodenhausen, G. and D. J. Ruben (1980). "Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy." *Chemical Physics Letters* 69(1): 185-189.
- Bolton, D. C., M. P. McKinley, et al. (1982). "Identification of a protein that purifies with the scrapie prion." *Science (New York, NY)* 218(4579): 1309.
- Bonsor, D. A., O. Hecht, et al. (2009). "Allosteric β -propeller signalling in TolB and its manipulation by translocating colicins." *The EMBO journal* 28(18): 2846-2857.
- Brombacher, E., C. Dorel, et al. (2003). "The curli biosynthesis regulator CsgD co-ordinates the expression of both positive and negative determinants for biofilm formation in *Escherichia coli*." *Microbiology* 149(10): 2847-2857.
- Brunger, A. T., P. D. Adams, et al. (1998). "Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination." *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 54(5): 905-921.
- Carver, T. E., B. Bordeau, et al. (2005). "Decrypting the Biochemical Function of an Essential Gene from *Streptococcus pneumoniae* Using ThermoFluor® Technology." *Journal of Biological Chemistry* 280(12): 11704-11712.
- Casadaban, M. (1976). "Transposition and fusion of the lac genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu." *Journal of molecular biology* 104(3): 541.

- Chan, A., E. G. Hutchinson, et al. (1993). "Identification, classification, and analysis of beta-bulges in proteins." *Protein Science* 2(10): 1574-1590.
- Chapman, M. R., L. S. Robinson, et al. (2002). "Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation." *Science* 295(5556): 851-855.
- Chatzi, K. E., M. F. Sardis, et al. (2013). "Breaking on through to the other side: protein export through the bacterial Sec system." *Biochemical Journal* 449(1): 25-37.
- Chen, V. B., W. B. Arendall, III, et al. (2010). "MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography." *Acta Crystallographica Section D* 66(1): 12-21.
- Chiti, F. and C. M. Dobson (2006). "Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease." *Annual Review of Biochemistry* 75(1): 333-366.
- Chou, J., J. Baber, et al. (2004). "Characterization of Phospholipid Mixed Micelles by Translational Diffusion." *Journal of Biomolecular NMR* 29(3): 299-308.
- Choudhury, D., A. Thompson, et al. (1999). "X-ray structure of the FimC-FimH chaperone-adhesin complex from uropathogenic *Escherichia coli*." *Science* 285(5430): 1061-1066.
- Claessen, D., R. Rink, et al. (2003). "A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in *Streptomyces coelicolor* by forming amyloid-like fibrils." *Genes & Development* 17(14): 1714-1726.
- Clore, G. M., C. Tang, et al. (2007). "Elucidating transient macromolecular interactions using paramagnetic relaxation enhancement." *Current Opinion in Structural Biology* 17(5): 603-616.
- Clubb, R. T., V. Thanabal, et al. (1992). "A constant-time three-dimensional triple-resonance pulse scheme to correlate intraresidue ^1H N, ^{15}N , and ^{13}C chemical shifts in ^{15}N - ^{13}C -labelled proteins." *Journal of Magnetic Resonance* (1969) 97(1): 213-217.
- Coligan, J. E., B. M. Dunn, et al. (2003). *Short protocols in protein science*, Wiley.
- Collinson, S. K., S. C. Clouthier, et al. (1996). "Salmonella enteritidis agfBAC operon encoding thin, aggregative fimbriae." *Journal of Bacteriology* 178(3): 662-667.
- Collinson, S. K., L. Emödy, et al. (1991). "Purification and characterization of thin, aggregative fimbriae from *Salmonella enteritidis*." *Journal of Bacteriology* 173(15): 4773-4781.
- Collinson, S. K., J. M. R. Parker, et al. (1999). "Structural predictions of AgfA, the insoluble fimbrial subunit of *Salmonella* thin aggregative fimbriae." *Journal of Molecular Biology* 290(3): 741-756.
- Coustou, V., C. Deleu, et al. (1997). "The protein product of the het-s heterokaryon incompatibility gene of the fungus *Podospora anserina* behaves as a prion analog." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94(18): 9773-9778.
- Cummings, M. D., M. A. Farnum, et al. (2006). "Universal Screening Methods and Applications of ThermoFluor®." *Journal of Biomolecular Screening* 11(7): 854-863.
- Dalbey, R. E. and A. Kuhn (2012). "Protein Traffic in Gram-negative bacteria – how exported and secreted proteins find their way." *FEMS Microbiology Reviews* 36(6): 1023-1045.
- de Gier, J.-W. L., P. Mansournia, et al. (1996). "Assembly of a cytoplasmic membrane protein in *Escherichia coli* is dependent on the signal recognition particle." *FEBS Letters* 399(3): 307-309.
- Derkatch, I. L., M. E. Bradley, et al. (2000). "Dependence and independence of [PSI⁺] and [PIN⁺]: a two-prion system in yeast?" *EMBO J* 19(9): 1942-1952.

- Diercks, T., M. Coles, et al. (1999). "An efficient strategy for assignment of cross-peaks in 3D heteronuclear NOESY experiments." *Journal of biomolecular NMR* 15(2): 177-180.
- DiMaio, F., T. C. Terwilliger, et al. (2011). "Improved molecular replacement by density-and energy-guided protein structure optimization." *Nature* 473(7348): 540-543.
- Dong, C., K. Beis, et al. (2006). "Wza the translocon for E. coli capsular polysaccharides defines a new class of membrane protein." *Nature* 444(7116): 226-229.
- Doreleijers, J. F., A. W. S. da Silva, et al. (2012). "CING: an integrated residue-based structure validation program suite." *Journal of biomolecular NMR* 54(3): 267-283.
- Du, Z., K.-W. Park, et al. (2008). "Newly identified prion linked to the chromatin-remodeling factor Swi1 in *Saccharomyces cerevisiae*." *Nat Genet* 40(4): 460-465.
- Eanes, E. D. and G. G. Glenner (1968). "X-RAY DIFFRACTION STUDIES ON AMYLOID FILAMENTS." *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 16(11): 673-677.
- Eichinger, A., I. Haneburger, et al. (2011). "Crystal structure of the sensory domain of *Escherichia coli* CadC, a member of the ToxR-like protein family." *Protein Science* 20(4): 656-669.
- Eisenberg, D. and M. Jucker (2012). "The Amyloid State of Proteins in Human Diseases." *Cell* 148(6): 1188-1203.
- Emsley, P., B. Lohkamp, et al. (2010). "Features and development of Coot." *Acta Crystallographica Section D* 66(4): 486-501.
- Engh, R. A. and R. Huber (1991). "Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement." *Acta Crystallographica Section A: Foundations of Crystallography* 47(4): 392-400.
- Epstein, E. A., M. A. Reizian, et al. (2009). "Spatial Clustering of the Curlin Secretion Lipoprotein Requires Curli Fiber Assembly." *Journal of Bacteriology* 191(2): 608-615.
- Ericsson, U. B., B. M. Hallberg, et al. (2006). "Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies." *Analytical Biochemistry* 357(2): 289-298.
- Ernst, R. R., G. Bodenhausen, et al. (1989). "Principles of nuclear magnetic resonance in one and two dimensions." *Physics Today* 42: 75.
- Evans, P. and A. McCoy (2007). "An introduction to molecular replacement." *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 64(1): 1-10.
- Fowler, D. M., A. V. Koulov, et al. (2005). "Functional Amyloid Formation within Mammalian Tissue." *PLoS Biol* 4(1): e6.
- Garman, E. F. and R. L. Owen (2005). "Cryocooling and radiation damage in macromolecular crystallography." *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 62(1): 32-47.
- Geddes, A. J., K. D. Parker, et al. (1968). "'Cross- β ' conformation in proteins." *Journal of Molecular Biology* 32(2): 343-344, 345-358.
- Gelis, I., A. M. J. J. Bonvin, et al. (2007). "Structural Basis for Signal-Sequence Recognition by the Translocase Motor SecA as Determined by NMR." *Cell* 131(4): 756-769.
- Gerlach, R. G. and M. Hensel (2007). "Protein secretion systems and adhesins: The molecular armory of Gram-negative pathogens." *International Journal of Medical Microbiology* 297(6): 401-415.
- Gerlach, R. G., D. Jäckel, et al. (2007). "Salmonella Pathogenicity Island 4 encodes a giant non-fimbrial adhesin and the cognate type 1 secretion system." *Cellular Microbiology* 9(7): 1834-1850.

- Gerstel, U., C. Park, et al. (2003). "Complex regulation of *csgD* promoter activity by global regulatory proteins." *Molecular Microbiology* 49(3): 639-654.
- Gerstel, U. and U. Römling (2001). "Oxygen tension and nutrient starvation are major signals that regulate *agfD* promoter activity and expression of the multicellular morphotype in *Salmonella typhimurium*." *Environmental Microbiology* 3(10): 638-648.
- Gerstel, U. and U. Römling (2003). "The *csgD* promoter, a control unit for biofilm formation in *Salmonella typhimurium*." *Research in Microbiology* 154(10): 659-667.
- Gibson, D. L., A. P. White, et al. (2007). "AgfC and AgfE facilitate extracellular thin aggregative fimbriae synthesis in *Salmonella Enteritidis*." *Microbiology* 153(4): 1131-1140.
- Greenfield, N. J. (2007). "Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions." *Nat. Protocols* 1(6): 2527-2535.
- Greenwald, J. and R. Riek (2010). "Biology of Amyloid: Structure, Function, and Regulation." *Structure* 18(10): 1244-1260.
- Grzesiek, S., J. Anglister, et al. (1993). "¹³C/¹⁵N-Enriched Proteins by Isotropic Mixing of ¹³C Magnetization." *Journal of magnetic resonance. Series B* 101: 114-119.
- Grzesiek, S. and A. Bax (1992). "An efficient experiment for sequential backbone assignment of medium-sized isotopically enriched proteins." *Journal of Magnetic Resonance* (1969) 99(1): 201-207.
- Grzesiek, S. and A. Bax (1992). "Improved 3D triple-resonance NMR techniques applied to a 31 kDa protein." *Journal of Magnetic Resonance* (1969) 96(2): 432-440.
- Grzesiek, S. and A. Bax (1993). "Amino acid type determination in the sequential assignment procedure of uniformly ¹³C/¹⁵N-enriched proteins." *Journal of biomolecular NMR* 3(2): 185-204.
- Gueiry, P. and T. Herrmann (2012). *Comprehensive Automation for NMR Structure Determination of Proteins. Protein NMR Techniques*. A. Shekhtman and D. S. Burz, Humana Press. 831: 429-451.
- Güntert, P., V. Dötsch, et al. (1992). "Processing of multi-dimensional NMR data with the new software PROSA." *Journal of biomolecular NMR* 2(6): 619-629.
- Güntert, P., C. Mumenthaler, et al. (1997). "Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the new program Dyana." *Journal of Molecular Biology* 273(1): 283-298.
- Hachmann, J. P. and J. W. Amshey (2005). "Models of protein modification in Tris–glycine and neutral pH Bis–Tris gels during electrophoresis: Effect of gel pH." *Analytical Biochemistry* 342(2): 237-245.
- Hammar, M., Z. Bian, et al. (1996). "Nucleator-dependent intercellular assembly of adhesive curli organelles in *Escherichia coli*." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93(13): 6562-6566.
- Hammar, M. r., A. Arnqvist, et al. (1995). "Expression of two *csg* operons is required for production of fibronectin- and Congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* K-12." *Molecular Microbiology* 18(4): 661-670.
- Hammer, N. D., J. C. Schmidt, et al. (2007). "The curli nucleator protein, CsgB, contains an amyloidogenic domain that directs CsgA polymerization." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(30): 12494-12499.

Quellenverzeichnis

Haneburger, I., A. Eichinger, et al. (2011). "New insights into the signaling mechanism of the pH-responsive, membrane-integrated transcriptional activator CadC of *Escherichia coli*." *Journal of Biological Chemistry* 286(12): 10681-10689.

Herrmann, T., P. Güntert, et al. (2002). "Protein NMR structure determination with automated NOE assignment using the new software CANDID and the torsion angle dynamics algorithm DYANA." *Journal of Molecular Biology* 319(1): 209-228.

Herrmann, T., P. Güntert, et al. (2002). "Protein NMR structure determination with automated NOE-identification in the NOESY spectra using the new software ATNOS." *Journal of biomolecular NMR* 24(3): 171-189.

Hinsa, S. M., M. Espinosa-Urgel, et al. (2003). "Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein." *Molecular Microbiology* 49(4): 905-918.

Hirota-Nakaoka, N., K. Hasegawa, et al. (2003). "Dissolution of β 2-Microglobulin Amyloid Fibrils by Dimethylsulfoxide." *Journal of Biochemistry* 134(1): 159-164.

Holm, L. and P. Rosenström (2010). "Dali server: conservation mapping in 3D." *Nucleic Acids Research* 38(suppl 2): W545-W549.

Howell, E. E., C. Booth, et al. (1990). "A second-site mutation at phenylalanine-137 that increases catalytic efficiency in the mutant aspartate-27. fwdarw. serine *Escherichia coli* dihydrofolate reductase." *Biochemistry* 29(37): 8561-8569.

Jarrett, J. T. and P. T. Lansbury Jr (1993). "Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: A pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie?" *Cell* 73(6): 1055-1058.

Jones, C. H., J. S. Pinkner, et al. (1995). "FimH adhesin of type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in the Enterobacteriaceae." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92(6): 2081-2085.

Jones, E. Y., S. J. Davis, et al. (1992). "Crystal structure at 2.8 [angst] resolution of a soluble form of the cell adhesion molecule CD2." *Nature* 360(6401): 232-239.

Kabsch, W. (2010). "XDS." *Acta Crystallographica Section D* 66(2): 125-132.

Kabsch, W. and C. Sander (1983). "Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features." *Biopolymers* 22(12): 2577-2637.

Kay, L. E. (1998). "Protein dynamics from NMR." *Biochemistry and cell biology* 76(2-3): 145-152.

Keller, R. (2004). *The computer aided resonance assignment tutorial*. Goldau, Schweiz, Cantina Verlag.

Kenney, J. M., D. Knight, et al. (2002). "Amyloidogenic nature of spider silk." *European Journal of Biochemistry* 269(16): 4159-4163.

Kikuchi, T., Y. Mizunoe, et al. (2005). "Curli fibers are required for development of biofilm architecture in *Escherichia coli* K-12 and enhance bacterial adherence to human uroepithelial cells." *Microbiology and immunology* 49(9): 875.

Kohler, R., D. Boehringer, et al. (2009). "YidC and Oxa1 Form Dimeric Insertion Pores on the Translating Ribosome." *Molecular cell* 34(3): 344-353.

Koradi, R., M. Billeter, et al. (1996). "MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures." *Journal of molecular graphics* 14(1): 51-55.

- Krissinel, E. and K. Henrick (2007). "Inference of macromolecular assemblies from crystalline state." *Journal of molecular biology* 372(3): 774-797.
- Kumar, A., R. R. Ernst, et al. (1980). "A two-dimensional nuclear Overhauser enhancement (2D NOE) experiment for the elucidation of complete proton-proton cross-relaxation networks in biological macromolecules." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 95(1): 1-6.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-685.
- Laskowski, R. A., M. W. MacArthur, et al. (1993). "PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures." *Journal of applied crystallography* 26(2): 283-291.
- Le Trong, I., P. Aprikian, et al. (2010). "Structural Basis for Mechanical Force Regulation of the Adhesin FimH via Finger Trap-like β Sheet Twisting." *Cell* 141(4): 645-655.
- Linge, J. P., M. A. Williams, et al. (2003). "Refinement of protein structures in explicit solvent." *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 50(3): 496-506.
- Loferer, H., M. Hammar, et al. (1997). "Availability of the fibre subunit CsgA and the nucleator protein CsgB during assembly of fibronectin-binding curli is limited by the intracellular concentration of the novel lipoprotein CsgG." *Molecular Microbiology* 26(1): 11-23.
- Lorber, B., J. B. Bishop, et al. (1990). "Purification of octyl β -d-glucopyranoside and re-estimation of its micellar size." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1023(2): 254-265.
- Lyons, B. and G. Montelione (1993). "An HCCNH triple-resonance experiment using carbon-13 isotropic mixing for correlating backbone amide and side-chain aliphatic resonances in isotopically enriched proteins." *Journal of magnetic resonance. Series B* 101(2): 206-209.
- Ma, B., T. Elkayam, et al. (2003). "Protein-protein interactions: Structurally conserved residues distinguish between binding sites and exposed protein surfaces." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(10): 5772-5777.
- Marion, D., L. E. Kay, et al. (1989). "Three-dimensional heteronuclear NMR of nitrogen-15 labeled proteins." *Journal of the American Chemical Society* 111(4): 1515-1517.
- Matthews, B. W. (1968). "Some crystal forms of bovine chymotrypsinogen B and chymotrypsinogen A." *Journal of Molecular Biology* 33(2): 499-501.
- McCoy, A. (2004). "Liking likelihood." *Acta Crystallographica Section D* 60(12 Part 1): 2169-2183.
- Montelione, G. T., B. A. Lyons, et al. (1992). "An efficient triple resonance experiment using carbon-13 isotropic mixing for determining sequence-specific resonance assignments of isotopically-enriched proteins." *Journal of the American Chemical Society* 114(27): 10974-10975.
- Mori, S., C. Abeygunawardana, et al. (1995). "Improved Sensitivity of HSQC Spectra of Exchanging Protons at Short Interscan Delays Using a New Fast HSQC (FHSQC) Detection Scheme That Avoids Water Saturation." *Journal of Magnetic Resonance, Series B* 108(1): 94-98.
- Nederveen, A. J., J. F. Doreleijers, et al. (2005). "RECOORD: A recalculated coordinate database of 500+ proteins from the PDB using restraints from the BioMagResBank." *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 59(4): 662-672.
- Nenninger, A. A., L. S. Robinson, et al. (2011). "CsgE is a curli secretion specificity factor that prevents amyloid fibre aggregation." *Mol Microbiol* 81(2): 486-499.
- Nenninger, A. A., L. S. Robinson, et al. (2009). "Localized and efficient curli nucleation requires the chaperone-like amyloid assembly protein CsgF." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(3): 900-905.

Quellenverzeichnis

- Neumann, M., P. J. Kahle, et al. (2002). "Misfolded proteinase K-resistant hyperphosphorylated α -synuclein in aged transgenic mice with locomotor deterioration and in human α -synucleinopathies." *The Journal of Clinical Investigation* 110(10): 1429-1439.
- Nielsen, H., J. Engelbrecht, et al. (1997). "Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites." *Protein engineering* 10(1): 1-6.
- Nishimori, J. H., T. N. Newman, et al. (2012). "Microbial Amyloids Induce Interleukin 17A (IL-17A) and IL-22 Responses via Toll-Like Receptor 2 Activation in the Intestinal Mucosa." *Infection and Immunity* 80(12): 4398-4408.
- Nishiyama, M., R. Horst, et al. (2005). "Structural basis of chaperone-subunit complex recognition by the type 1 pilus assembly platform FimD." *EMBO J* 24(12): 2075-2086.
- Nishiyama, M., T. Ishikawa, et al. (2008). "Reconstitution of pilus assembly reveals a bacterial outer membrane catalyst." *Science* 320(5874): 376-379.
- Nishiyama, M., M. Vetsch, et al. (2003). "Identification and Characterization of the Chaperone-Subunit Complex-binding Domain from the Type 1 Pilus Assembly Platform FimD." *Journal of Molecular Biology* 330(3): 513-525.
- Nordstedt, C., J. Näslund, et al. (1994). "The Alzheimer A beta peptide develops protease resistance in association with its polymerization into fibrils." *Journal of Biological Chemistry* 269(49): 30773-30776.
- Nummelin, H., M. C. Merckel, et al. (2004). "The Yersinia adhesin YadA collagen-binding domain structure is a novel left-handed parallel $[\beta]$ -roll." *EMBO J* 23(4): 701-711.
- O'Connell, M. R., R. Gamsjaeger, et al. (2009). "The structural analysis of protein-protein interactions by NMR spectroscopy." *PROTEOMICS* 9(23): 5224-5232.
- Oh, J., J.-G. Kim, et al. (2007). "Amyloidogenesis of Type III-dependent Harpins from Plant Pathogenic Bacteria." *Journal of Biological Chemistry* 282(18): 13601-13609.
- Olsén, A., A. Arnqvist, et al. (1993). "The RpoS Sigma factor relieves H-NS-mediated transcriptional repression of csgA, the subunit gene of fibronectin-binding curli in *Escherichia coli*." *Molecular Microbiology* 7(4): 523-536.
- Olsen, A., A. Jonsson, et al. (1989). "Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*." *Nature* 338(6217): 652-655.
- Oppong, G. O., G. J. Rapsinski, et al. (2013). "Epithelial Cells Augment Barrier Function via Activation of the Toll-Like Receptor 2/Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway upon Recognition of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Curli Fibrils in the Gut." *Infection and Immunity* 81(2): 478-486.
- Otzen, D. and P. H. Nielsen (2008). "We find them here, we find them there: Functional bacterial amyloid." *Cellular and Molecular Life Sciences* 65(6): 910-927.
- Palmer, T. and B. C. Berks (2012). "The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway." *Nat Rev Micro* 10(7): 483-496.
- Parsons, L., E. Eisenstein, et al. (2001). "Solution Structure of HI0257, a Bacterial Ribosome Binding Protein†,‡." *Biochemistry* 40(37): 10979-10986.
- Pervushin, K., R. Riek, et al. (1997). "Attenuated T2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94(23): 12366-12371.

- Polikanov, Y. S., G. M. Blaha, et al. (2012). "How Hibernation Factors RMF, HPF, and YfiA Turn Off Protein Synthesis." *Science* 336(6083): 915-918.
- Prigent-Combaret, C., E. Brombacher, et al. (2001). "Complex Regulatory Network Controls Initial Adhesion and Biofilm Formation in *Escherichia coli* via Regulation of the *csgD* Gene." *Journal of Bacteriology* 183(24): 7213-7223.
- Proft, T. and E. N. Baker (2009). "Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria — structure, assembly and their role in disease." *Cellular and Molecular Life Sciences* 66(4): 613-635.
- Ramachandran, G. N. and V. Sasisekharan (1968). *Conformation of Polypeptides and Proteins. Advances in Protein Chemistry Volume 23*. 23: 283-437.
- Read, R. (2001). "Pushing the boundaries of molecular replacement with maximum likelihood." *Acta Crystallographica Section D* 57(10): 1373-1382.
- Remaut, H., C. Tang, et al. (2008). "Fiber Formation across the Bacterial Outer Membrane by the Chaperone/Usher Pathway." *Cell* 133(4): 640-652.
- Richardson, J. S., E. D. Getzoff, et al. (1978). "The beta bulge: a common small unit of nonrepetitive protein structure." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 75(6): 2574-2578.
- Richardson, J. S. and D. C. Richardson (2002). "Natural β -sheet proteins use negative design to avoid edge-to-edge aggregation." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(5): 2754-2759.
- Ritter, C., M.-L. Maddelein, et al. (2005). "Correlation of structural elements and infectivity of the HET-s prion." *Nature* 435(7043): 844-848.
- Robinson, L. S., E. M. Ashman, et al. (2006). "Secretion of curli fibre subunits is mediated by the outer membrane-localized CsgG protein." *Molecular Microbiology* 59(3): 870-881.
- Römling, U., Z. Bian, et al. (1998). "Curli Fibers Are Highly Conserved between *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* with Respect to Operon Structure and Regulation." *Journal of Bacteriology* 180(3): 722-731.
- Römling, U., M. Rohde, et al. (2000). "AgfD, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella typhimurium* regulates at least two independent pathways." *Molecular Microbiology* 36(1): 10-23.
- Rossmann, M. G. and D. M. Blow (1962). "The detection of sub-units within the crystallographic asymmetric unit." *Acta Crystallographica* 15(1): 24-31.
- Salgado, P. S., J. D. Taylor, et al. (2011). "Extending the usability of the phasing power of diselenide bonds: SeCys SAD phasing of CsgC using a non-auxotrophic strain." *Acta Crystallographica Section D* 67(1): 8-13.
- Sauer, F. G., K. Fütterer, et al. (1999). "Structural basis of chaperone function and pilus biogenesis." *Science* 285(5430): 1058-1061.
- Sauer, F. G., J. S. Pinkner, et al. (2002). "Chaperone Priming of Pilus Subunits Facilitates a Topological Transition that Drives Fiber Formation." *Cell* 111(4): 543-551.
- Schirmer, T., T. A. Keller, et al. (1995). "Structural basis for sugar translocation through maltoporin channels at 3.1 Å resolution." *Science* 267(5197): 512-514.
- Shahid, S. A., B. Bardiaux, et al. (2012). "Membrane-protein structure determination by solid-state NMR spectroscopy of microcrystals." *Nat Meth* 9(12): 1212-1217.

- Shaka, A. J., C. J. Lee, et al. (1988). "Iterative schemes for bilinear operators; application to spin decoupling." *Journal of Magnetic Resonance* (1969) 77(2): 274-293.
- Shu, Q., S. L. Crick, et al. (2012). "The E. coli CsgB nucleator of curli assembles to β -sheet oligomers that alter the CsgA fibrillization mechanism." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(17): 6502-6507.
- Si, K., S. Lindquist, et al. (2003). "A Neuronal Isoform of the Aplysia CPEB Has Prion-Like Properties." *Cell* 115(7): 879-891.
- Sjöbring, U., G. Pohl, et al. (1994). "Plasminogen, absorbed by Escherichia coli expressing curli or by Salmonella enteritidis expressing thin aggregative fimbriae, can be activated by simultaneously captured tissue-type plasminogen activator (t-PA)." *Molecular Microbiology* 14(3): 443-452.
- Soto, G. E. and S. J. Hultgren (1999). "Bacterial Adhesins: Common Themes and Variations in Architecture and Assembly." *Journal of Bacteriology* 181(4): 1059-1071.
- Strong, M., M. R. Sawaya, et al. (2006). "Toward the structural genomics of complexes: Crystal structure of a PE/PPE protein complex from Mycobacterium tuberculosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(21): 8060-8065.
- Takeuchi, K. and G. Wagner (2006). "NMR studies of protein interactions." *Current Opinion in Structural Biology* 16(1): 109-117.
- Taylor, Jonathan D., Y. Zhou, et al. (2011). "Atomic Resolution Insights into Curli Fiber Biogenesis." *Structure* 19(9): 1307-1316.
- Tollin, P. and M. G. Rossmann (1966). "A description of various rotation function programs." *Acta Crystallographica* 21(6): 872-876.
- True, H. L. and S. L. Lindquist (2000). "A yeast prion provides a mechanism for genetic variation and phenotypic diversity." *Nature* 407(6803): 477-483.
- Tükel, Ç., J. H. Nishimori, et al. (2010). "Toll-like receptors 1 and 2 cooperatively mediate immune responses to curli, a common amyloid from enterobacterial biofilms." *Cellular Microbiology* 12(10): 1495-1505.
- Tükel, Ç., R. P. Wilson, et al. (2009). "Responses to Amyloids of Microbial and Host Origin Are Mediated through Toll-like Receptor 2." *Cell host & microbe* 6(1): 45-53.
- Van Melckebeke, H., C. Wasmer, et al. (2010). "Atomic-Resolution Three-Dimensional Structure of HET-s(218-289) Amyloid Fibrils by Solid-State NMR Spectroscopy." *Journal of the American Chemical Society* 132(39): 13765-13775.
- Verger, D., E. Miller, et al. (2006). "Molecular mechanism of P pilus termination in uropathogenic Escherichia coli." *EMBO Rep* 7(12): 1228-1232.
- Vidal, O., R. Longin, et al. (1998). "Isolation of an Escherichia coli K-12 Mutant Strain Able To Form Biofilms on Inert Surfaces: Involvement of a New ompR Allele That Increases Curli Expression." *Journal of Bacteriology* 180(9): 2442-2449.
- Virchow, R. (1854). "Ueber eine im Gehirn und Rückenmark des Menschen aufgefundenene Substanz mit der chemischen Reaction der Cellulose." *Virchows Archiv* 6(1): 135-138.
- Vogt, G. and P. Argos (1997). "Protein thermal stability: hydrogen bonds or internal packing?" *Folding and Design* 2: S40-S46.
- Vranken, W. F., W. Boucher, et al. (2005). "The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline." *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 59(4): 687-696.

- Walburger, A., C. Lazdunski, et al. (2002). "The Tol/Pal system function requires an interaction between the C-terminal domain of TolA and the N-terminal domain of TolB." *Molecular microbiology* 44(3): 695-708.
- Wang, X., D. R. Smith, et al. (2007). "In Vitro Polymerization of a Functional Escherichia coli Amyloid Protein." *Journal of Biological Chemistry* 282(6): 3713-3719.
- Wasmer, C., A. Lange, et al. (2008). "Amyloid Fibrils of the HET-s(218–289) Prion Form a β Solenoid with a Triangular Hydrophobic Core." *Science* 319(5869): 1523-1526.
- Wimberly, B. T., D. E. Brodersen, et al. (2000). "Structure of the 30S ribosomal subunit." *Nature* 407(6802): 327-339.
- Wittekind, M. and L. Mueller (1993). "HNCACB, a High-Sensitivity 3D NMR Experiment to Correlate Amide-Proton and Nitrogen Resonances with the Alpha- and Beta-Carbon Resonances in Proteins." *J Magn Reson, Ser B* 101(2): 201-205.
- Wösten, H. A. B. and M. L. de Vocht (2000). "Hydrophobins, the fungal coat unravelled." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* 1469(2): 79-86.
- Wüthrich, K. (1986). *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Vol. 292, John Wiley & Sons, New York.
- Wüthrich, K. (1990). "Protein structure determination in solution by NMR spectroscopy." *Journal of Biological Chemistry* 265(36): 22059-22062.
- Xie, K. and R. E. Dalbey (2008). "Inserting proteins into the bacterial cytoplasmic membrane using the Sec and YidC translocases." *Nature Reviews Microbiology* 6(3): 234-244.
- Zavialov, A. V., V. M. Tischenko, et al. (2005). "Resolving the energy paradox of chaperone/usher-mediated fibre assembly." *Biochem. J.* 389(3): 685-694.
- Zhou, J. and Z. Xu (2005). "The structural view of bacterial translocation-specific chaperone SecB: implications for function." *Molecular Microbiology* 58(2): 349-357.
- Zogaj, X., W. Bokranz, et al. (2003). "Production of Cellulose and Curli Fimbriae by Members of the Family Enterobacteriaceae Isolated from the Human Gastrointestinal Tract." *Infection and Immunity* 71(7): 4151-4158.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Christiane Ritter für die schöne Zeit in ihrer Arbeitsgruppe und für die Überlassung dieses interessanten und durchaus herausfordernden Promotionsthemas bedanken. Dabei stand sie mir stets fachlich mit neuen Ideen zur Seite und hat mir großen wissenschaftlichen Freiraum gelassen.

Außerdem möchte ich mich bei Prof. Dr. Stefan Dübel für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens und bei PD Dr. Michael Hust für die freundliche Übernahme des Prüfungsvorsitzes recht herzlich bedanken.

Mein Dank gilt auch den Mitgliedern meines Thesiskomitees, Dr. Siegfried Weiß Prof. Dr. Dirk Heinz und Dr. Andrea Scrima, die meine Arbeit begleitet und mit interessanten Vorschlägen unterstützt haben.

Bei Dr. Matthew Chapman und Margery Evans möchte ich mich für die fruchtbare Kooperation und die durchgeführten *in vivo* Studien bedanken.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Dr. Thorsten Lühns für die großartige Unterstützung hinsichtlich der NMR-Experimente und der Strukturrechnung, wodurch ich sehr viel Neues lernen konnte.

Dr. Jörn Krause danke ich für die Unterrichtung in Röntgenstrukturanalyse und die Unterstützung beim Lösen der Kristallstruktur.

Ich danke außerdem dem Team von Dr. Manfred Nimtz, insbesondere Anja Meier und Undine Felgenträger für die Messung von Massenspektren.

Ebenso danke ich Rita Getzlaff und Beate Jaschok-Kentner für die Durchführung von N-terminalen Sequenzierungen.

Danksagung

Bedanken möchte ich mich zusätzlich bei meiner Masterstudentin Janika Viereck und bei meiner Praktikantin Miriam Weckener für das große Interesse an den Projekten und für die sehr gute Arbeit, die sie geleistet haben.

Mein Dank gilt auch besonders Caroline Schaper für die wertvolle Unterstützung, die sie mir zuteilwerden ließ.

Bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Makromolekulare Interaktionen möchte ich mich für die großartige Arbeitsatmosphäre, Hilfs- und Diskussionsbereitschaft bedanken. Ebenso gilt mein Dank der gesamten Abteilung Strukturbioogie für das angenehme Laborklima und die gute Kollegialität, die ich erfahren durfte.

Für den regen wissenschaftlichen Gedankenaustausch und die immerwährende Diskussionsbereitschaft möchte ich mich zusätzlich bei Jan Hellert bedanken, da dies sehr inspirierend war.

Besonders möchte ich mich auch bei Tobias Schubeis und Lichun He für die gute Zusammenarbeit im Büro bedanken, wodurch unzählige Probleme diskutiert und gelöst werden konnten.

Zu guter Letzt gilt mein besonderer Dank meiner Familie und vor allem meiner Freundin Kathleen, die sich in dieser entbehrungsreichen Zeit um unsere Kinder gekümmert hat. Diese Unterstützung hat mir beim Anfertigen dieser Arbeit sehr geholfen.